



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



Facultad de Veterinaria  
Universidad de la República  
Uruguay

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**INTERACCIÓN ENTRE EL SISTEMA ENDÓCRINO-  
METABÓLICO E INMUNE EN VACAS LECHERAS DURANTE EL  
PERIPARTO**

**MAURICIO BENTANCOR CAMEJO**

**TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL**

**URUGUAY**

**2020**





UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



Facultad de Veterinaria  
Universidad de la República  
Uruguay

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**INTERACCIÓN ENTRE EL SISTEMA ENDÓCRINO-  
METABÓLICO E INMUNE EN VACAS LECHERAS DURANTE EL  
PERIPARTO**

**MAURICIO BENTANCOR CAMEJO**

---

Dra. Ana Meikle  
**Directora de Tesis**

Dr. Joaquín Barca  
**Co-director de Tesis**

**2020**

*Mauricio Bentancor ©*

## **INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS**

**Rodrigo Puentes, PhD**

*Departamento de Ciencias Microbiológicas*

*Facultad de Veterinaria*

*Universidad de la República - Uruguay*

**Fernando Nogueira de Souza, PhD**

*Departamento de Inmunología*

*Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia*

*Universidad de San Pablo - Brasil*

**María de Lourdes Adrien, PhD**

*Departamento de Salud en los Sistemas Pecuarios*

*Facultad de Veterinaria*

*Universidad de la República - Uruguay*



**FACULTAD DE VETERINARIA  
Programa de Posgrados**

**ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS  
DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL**

**INTERACCIÓN ENTRE EL SISTEMA ENDÓCRINO-  
METABÓLICO E INMUNE EN VACAS LECHERAS DURANTE EL  
PERIPARTO**

**Por: Dr. Mauricio Bentancor Camejo**

**Directora de Tesis: Dra. Ana Meikle  
Codirector de Tesis: Dr. Álvaro Barca**

**Tribunal**

**Presidente: Dr. Rodrigo Puentes  
Segundo Miembro: Dr. Fernando Nogueira De Souza  
Tercer Miembro: Dra. Lourdes Adrién**

**Fallo del Tribunal: Aprobada con mención (S.S.S 12).**

**MIÉRCOLES 9 DE SETIEMBRE DE 2020**

**PLATAFORMA ZOOM, POSGRADO**

**El Fallo de aprobación de la Tesis puede ser: Aprobada (corresponde a la nota BBB- en el Acta), o Aprobada con Mención (corresponde a la nota \$\$\$- 12 en el Acta)**



## ACTA DE EXAMEN

**CURSO:** Defensa de Tesis de Maestría

**LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA:** Sala Virtual de Plataforma Zoom, Facultad de Veterinaria, Udelar, miércoles 9 de setiembre de 2020

**Tribunal:** Dr. Rodrigo Puentes (Presidente), Dr. Fernando Nogueira De Souza, Dra. Lourdes Adrién

CI ESTUDIANTE	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
4.754.362-7	BENTANCOR CAMEJO, Mauricio	S.S.S	12

PRESENTADOS	NO PRESENTADOS	APROBADOS	APLAZADOS	INSCRIPTOS
1	0	1	0	1

### TRIBUNAL

Dr. Rodrigo Puentes (Presidente)

Dr. Fernando Nogueira De Souza

Dra. Lourdes Adrién

### FIRMA

Montevideo, 16 de setiembre de 2020

**FALLO DEL TRIBUNAL TESIS DE MAESTRIA MAURICIO BENTANCOR  
CAMEJO:**

La tesis de maestría presentada el 9 de setiembre del 2020 por el Dr. Mauricio Bentancor titulada *"Interacción entre el sistema endócrino- metabólico e inmune en vacas lecheras durante el parto"* tuvo como objetivo principal contribuir al entendimiento de la interacción entre el sistema endócrino, metabólico e inmune en vacas lecheras, bajo un sistema de alimentación semipastoril, durante el período parto.

Esta es una temática de suma relevancia para el país, donde el mismo grupo de investigación ha generado importantes aportes desde hace varios años. En esta oportunidad, la tesis fue planteada con un abordaje novedoso, vinculando al sistema inmune con los cambios endocrino-metabólicos, con resultados sumamente interesantes para el Uruguay y para la comunidad científica internacional.

El texto entregado está redactado de forma muy clara y ordenada, lo que demuestran el gran compromiso y solvencia de conocimientos del estudiante. El tribunal realizó algunas sugerencias respecto al material escrito, planteamiento de hipótesis, objetivos y materiales y métodos que fueron discutidos durante la defensa y que serán tenidos en cuenta por el estudiante al momento de la entrega final del manuscrito.

Su exposición fue muy sólida y ordenada en el desarrollo. Posteriormente la defensa fue contundente, contestando con precisión las preguntas del tribunal.

Por lo ante dicho, se califica la tesis aprobada con mención (S.S.S 12).

TRIBUNAL:

Rodrigo Puentes (Presidente)



Lourdes Adrien



Fernando de Souza





*“Little science takes you away from God but more of it takes you to Him”*

*Louis Pasteur*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco el interminable apoyo de mis amigos, familia y colegas, a través de estos años. Me gustaría agradecer a los miembros de mi equipo de orientadores: Ana Meikle y Joaquín Barca, los cuales me han brindado su apoyo genuino, desde los inicios de mi formación de grado. El amor por la investigación y la pasión por el trabajo, promueven la creatividad, la productividad y el anhelo de continuar en los pasos de la ciencia. Sin dudas, la retroalimentación continua, el incentivo y el rigor científico, han contribuido formidablemente a mi formación académica.

Agradecer especialmente a Victoria de Brun, Andrea Graña y Sofía Cabrera, quienes han dado su tiempo, estímulo, experiencia y amabilidad, durante mi trabajo experimental. También me gustaría agradecer a: Gretel Ruprechter, Andrea Fernandez-Foren, Claudia Menezes, Paula Pessina, Irene Cruz, Rosina Sánchez e Isabel Sartore, por su valioso apoyo y por los gratificantes momentos compartidos. El laboratorio es un grupo excepcional, que promueve rigurosidad científica y formación, en conjunto con un sentimiento de pertenencia y compañerismo.

Me gustaría agradecer a los miembros del Departamento de Microbiología de la Facultad de Veterinaria, especialmente a Rodrigo Puentes, por apoyar esta investigación y abrirnos las puertas de su laboratorio. Por otro lado, dar un agradecimiento especial a la familia Wiebe - Matern, por confiar plenamente y permitirnos la realización de nuestro estudio en su establecimiento. Reconocer el apoyo dado por el Prof. Dr. Ynte Schukken, por la cooperación brindada en la realización de esta investigación.

Agradecer enormemente a mis amigos y familiares, los cuales me brindaron apoyo durante los momentos transcurridos en estos últimos dos años. A mis padres, Danilo y Luján, mi hermana, María Eugenia, Germán, por su continuo apoyo y aliento. Les agradezco por trasmitirme la pasión por la producción lechera, el amor por el trabajo, el progreso y por sobre todo, por los valores trasmitidos.

A todos, gracias

\*\*\*

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

Resumen	11
Summary	12
Lista de tablas y figuras	13
Lista de abreviaturas	14
1. Introducción	15
2. Antecedentes específicos	16
2.1 Caracterización de la producción lechera en Uruguay	16
2.2 Período de transición: regulación endócrina del metabolismo	16
2.3 Sistema inmune innato y adaptativo durante el período de transición	20
2.4 Inflamación durante el período de transición	22
3. Caracterización del problema	26
4. Hipótesis	27
5. Objetivos	27
5.1 Objetivo general	27
5.2 Objetivos específicos	27
6. Materiales y métodos	28
6.1 Localización y período de estudio	28
6.2 Caracterización del predio	28
6.3 Experimento I	28
6.3.1 Animales y diseño experimental	28
6.3.2 Determinación de metabolitos	29
6.3.3 Ensayos hormonales	29
6.3.4 Conteo total y diferencial de leucocitos	29
6.3.5 Producción de leche	30
6.4 Experimento II	30
6.4.1 Animales y diseño experimental	30
6.4.2 Ensayos hormonales	30
6.4.3 Aislamiento de las células mononucleares	30
6.4.4 Maduración de las PBMC con <i>E. coli</i> irradiada con UV	31
6.4.5 Medición de TNF- $\alpha$ mediante kit ELISA	31
6.5 Análisis estadístico	31
7. Resultados	33
7.1 Experimento I	33
7.1.1 Condición corporal y producción de leche	33
7.1.2 Concentración de ácidos grasos no esterificados y $\beta$ -hidroxibutirato	33
7.1.3 Concentración de colesterol, proteína total, albúmina y calcio	35
7.1.4 Concentraciones hormonales	36
7.1.5 Conteo total y diferencial de leucocitos	37
7.2 Experimento II	38
7.2.1 Concentración de metabolitos	38
7.2.2 Concentraciones hormonales	38
7.2.3 Curvas de producción de TNF- $\alpha$ luego de la estimulación <i>in vitro</i> con <i>E. coli</i>	39
8. Discusión	41
8.1 Experimento I	41
8.2 Experimento II	48
9. Conclusiones	54
10. Referencias bibliográficas	55
11. Anexo	71

## RESUMEN

En el experimento I, se estudió el efecto de la paridad (primíparas vs multíparas) sobre el perfil endócrino-metabólico y en términos de recuento de leucocitos durante el período periparto, en 32 vacas lecheras en pastoreo. La condición corporal (CC), y las concentraciones de ácidos grasos no esterificados (NEFA),  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB), colesterol, proteína total, albúmina, calcio, insulina, IGF-I, leptina, adiponectina y el recuento total y diferencial de glóbulos blancos, fueron determinados durante el periparto. Los datos se analizaron con el procedimiento mixto incluyendo en el modelo estadístico la paridad, período e interacción. Las vacas primíparas tuvieron una disminución más pronunciada de CC que las vacas multíparas y produjeron menos leche que las vacas multíparas. Las vacas primíparas tuvieron una mayor concentración de NEFA durante el período en estudio. Las vacas multíparas tuvieron una concentración de proteína total más alta antes del parto y una concentración de calcio más baja en el posparto. Las concentraciones hormonales disminuyeron alrededor del parto. Las vacas primíparas presentaron un descenso más pronunciado de IGF-I alrededor del parto que las vacas multíparas. El recuento total de leucocitos fue más bajo en la primera semana posparto pero no se encontró efecto de la paridad. El balance energético negativo (BEN) reflejado a través de la evolución de la CC, los perfiles endócrinos y metabólicos durante el periparto de vacas lecheras en sistema mixto de alimentación, se asoció con una disminución del recuento de células del sistema inmune innato y adquirido. Las observaciones en el perfil endócrino-metabólico mostraron un perfil más desequilibrado en vacas primíparas en comparación con sus homólogas multíparas, lo que indica un desequilibrio energético más pronunciado en esta categoría. Sin embargo, el desequilibrio energético en las vacas primíparas no se visualizó en el recuento de leucocitos circulantes, lo que denota que la paridad no afectó dichas variables.

El objetivo del experimento II fue describir el efecto de la etapa de lactancia (lactancia temprana vs lactancia media) sobre la funcionalidad de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en términos de respuesta de factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), en vacas lecheras en pastoreo, no gestantes, desafiadas *in vitro* con *Escherichia coli*. Se recogió sangre periférica a los  $14 \pm 4$  días después del parto (grupo de lactancia temprana, n= 9) y a los  $123 \pm 31$  días después del parto (grupo de lactancia media, n= 9). Las PBMC se cultivaron conjuntamente con el suero autólogo ó suero fetal bovino. La maduración de las PBMC fue inducida por estimulación bacteriana mediante la adición de *E. coli* irradiada con UV proveniente de un caso de mastitis clínica. Las concentraciones de TNF- $\alpha$  en los sobrenadantes de los cultivo se analizaron por el procedimiento mixto, incluyendo en el modelo estadístico el grupo (lactancia temprana vs lactancia media), suero (suero autólogo vs suero fetal bovino), tiempo y sus interacciones. La respuesta de TNF- $\alpha$  después de la exposición a *E. coli* fue mayor y más rápida en la lactancia temprana que en las vacas de media lactancia, cuando las PBMC se cultivaron conjuntamente en suero autólogo. En contraste, no se observaron diferencias entre los grupos cuando las células se cultivaron conjuntamente con suero fetal bovino. Estos datos sugieren, que la etapa de lactancia y el tipo de suero juegan un papel importante en la capacidad de respuesta de las PBMC en términos de producción de TNF- $\alpha$ .

Palabras clave: inmunosupresión, paridad, movilización, inflamación posparto, TNF- $\alpha$

## SUMMARY

### Interaction of metabolism and immune system in periparturient grazing dairy cows

In experiment I, the effect of parity (primiparous vs multiparous) on endocrine-metabolic profiles and leukocyte count in the peripartum period were studied in 32 grazing dairy cows. Body condition score (BCS), concentration of non-esterified fatty acids (NEFA),  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB), cholesterol, total protein, albumin, calcium, insulin, IGF-I, leptin, adiponectin and total and differential white blood cell count were determined around to calving. Data were analyzed using the mixed procedure, included effects of parity, time to calving and interactions. Primiparous cows had a lower BCS during the peripartum period and produced less milk than multiparous cows. They also had a higher NEFA concentration. Multiparous cows had a higher total protein concentration before calving and a lower calcium concentration after calving. All hormone concentrations diminished around calving. Primiparous cows presented a steeper decline of IGF-I around calving than multiparous cows. The total white blood cell count was lower in the first postpartum week, but no parity effect was found. The negative energy balance (BEN) reflected through the evolution of BCS, endocrine and metabolic profiles during the peripartum of grazing dairy cows, was associated with a decrease in the cell count of the innate and acquired immune system. The endocrine-metabolic profile of primiparous cows indicated a more pronounced energy deficit than in multiparous cows, but there was no difference in the circulating leukocyte count.

The objective of experiment II was to describe the effect of the lactation stage (early lactation vs mid lactation) on the functionality of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of non-pregnant grazing dairy cows measured by tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) response when *in vitro* challenged with *Escherichia coli*. Peripheral blood was collected at  $14 \pm 4$  days after calving (early lactation group, n= 8) and at  $123 \pm 31$  days after calving (mid lactation group, n= 8). The PBMC were co-cultured with either the autologous serum or fetal bovine serum. Maturation of PBMC was induced by bacterial stimulation through the addition of UV irradiated *E. coli* from a clinical mastitis case. TNF- $\alpha$  concentrations in culture supernatants were measured and the results analyzed using mixed procedure, including in the statistical model the group (early vs mid-lactation), serum (autologous serum vs fetal bovine serum), time and their interactions. The TNF- $\alpha$  response after *E. coli* challenge was stronger and faster in early lactation than mid lactation cows when PBMC were co-cultured in autologous serum. In contrast, no differences were observed between the early and mid lactation groups when cells were co-cultured with fetal bovine serum. These data suggest that the lactation stage and type of serum play an important role in the TNF- $\alpha$  response of the PBMC.

Key words: immunosuppression, parity, fat mobilization, postpartum inflammation, TNF- $\alpha$

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

- Tabla 1.** Pruebas F de efectos fijos incluidos en el modelo para parámetros en vacas primíparas y multíparas en condiciones de pastoreo. Los efectos fijos fueron paridad, período y la interacción entre ambos.
- Tabla 2.** Efecto del período de lactancia (lactancia temprana vs lactancia media) sobre las concentraciones séricas (media  $\pm$  error) de NEFA, BHB, colesterol, proteína total, albúmina y calcio.
- Tabla 3.** Efecto del período de lactancia (lactancia temprana vs lactancia media) sobre las concentraciones séricas (media  $\pm$  error) de insulina, IGF-I, leptina y adiponectina.
- Figura 1.** Evolución de (a) la condición corporal (media  $\pm$  error) y (b) producción de leche (kg), en vacas primíparas (L1, n= 16) y en vacas multíparas (L2, n= 16), bajo un sistema de mixto de alimentación. Las diferencias entre grupos de paridad se determinaron mediante medidas repetidas con las pruebas de Tukey-Kramer indicadas con un asterisco (\*)  $P \leq 0,05$ .
- Figura 2.** Perfiles en las concentraciones séricas (media  $\pm$  error) de (a) NEFA (mmol/L) y (b) BHB (mmol/L), en vacas primíparas (L1) y vacas multíparas (L2). Los asteriscos (\*) indican diferencias en  $P \leq 0,05$ .
- Figura 3.** Perfiles en las concentraciones séricas (media  $\pm$  error) de (a) colesterol (mmol/L), (b) proteína total (g/L), (c) albúmina (g/L) y (d) calcio (mmol/L), en vacas primíparas (L1) y vacas multíparas (L2). Los asteriscos (\*) indican diferencias en  $P \leq 0,05$ .
- Figura 4.** Perfiles en las concentraciones séricas (media  $\pm$  error) de (a) insulina (ng/mL), (b) IGF-I (ng/mL), (c) leptina (ng/mL) y (d) adiponectina (ng/mL), en vacas primíparas (L1) y vacas multíparas (L2). Los asteriscos (\*) indican diferencias en  $P \leq 0,05$ .
- Figura 5.** Conteo (media  $\pm$  error) de (a) células blancas (WBC;  $\times 10^9$ /mL), (b) neutrófilos ( $\times 10^9$ /mL), (c) linfocitos ( $\times 10^9$ /mL) y (d) monocitos ( $\times 10^9$ /mL), en vacas primíparas (L1) y vacas multíparas (L2).
- Figura 6.** Concentración de TNF- $\alpha$  (ng/mL)/ $10^5$  PBMC luego de la estimulación (hs) con *E. coli* ECC-Z irradiada con UV en cultivos de PBMC en suero autólogo (a) y suero fetal bovino (b) según lo determinado por el kit de ELISA. Las líneas negras continuas representan el grupo de lactancia temprana ( $14 \pm 4$  DPP) y las líneas punteadas el grupo de lactancia media ( $123 \pm 31$  DPP). Todos los puntos representan la media (n= 8) con barras de error que simbolizan el error estándar. Las diferencias significativas se determinaron mediante medidas repetidas con las pruebas de Tukey-Kramer indicadas con un asterisco (\*)  $P \leq 0,05$ .
- Figura 7.** Correlación entre la concentración de TNF- $\alpha$  (ng/mL)/ $10^5$  PBMC a las 8 hs post-desafío *in vitro* con *E. coli* y los niveles séricos de NEFA (mmol/L), de vacas Holstein-Friesian multíparas no gestantes y de un sistema mixto de producción. La línea sólida representa la correlación lineal de Pearson.

## LISTA DE ABREVIATURAS

APP	<i>Acute-phase protein</i>
BEN	<i>Balance energético negativo</i>
BHB	<i>Ácido betahidroxibutírico</i>
CC	<i>Condición corporal</i>
CV	<i>Coefficiente de variación</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked-immunosorbent assay</i>
GH	<i>Growth hormone</i>
GH-R	<i>Growth hormone receptor</i>
IFN $\gamma$	<i>Interferón gamma</i>
IGF-I	<i>Insulin-like-growth factor-I</i>
IL-1 $\beta$	<i>Interleukin - 1 beta</i>
IL-4	<i>Interleukin 4</i>
IL-6	<i>Interleukin 6</i>
IL-8	<i>Interleukin 8</i>
IL-10	<i>Interleukin 10</i>
IL-12	<i>Interleukin 12</i>
IRMA	<i>Immunoradiometric assay</i>
L1	<i>Primípara</i>
L2	<i>Múltipara</i>
LM	<i>Lactancia media</i>
LPS	<i>Lipopolisacárido</i>
LT	<i>Lactancia temprana</i>
MEC	<i>Mammary epithelial cell</i>
mo-DC	<i>Monocyte-derived dendritic cell</i>
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
MS	<i>Materia seca</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
nAPP	<i>Negative acute-phase protein</i>
NEFA	<i>Non-esterified fatty acid</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor - kappa B</i>
NK	<i>Natural killer</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
pAPP	<i>Positive acute-phase protein</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PMN	<i>Polymorphonuclear</i>
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
RIA	<i>Radioimmunoassay</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
SA	<i>Suero autólogo</i>
SAA1	<i>Serum amyloid A1</i>
SFB	<i>Suero fetal bovino</i>
TLR-4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TMR	<i>Total mixed ration</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>

## 1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, ha existido una selección genética en las poblaciones de vacas lecheras con el fin de incrementar la producción, progreso suscitado para satisfacer las necesidades tanto de la industria como de la sociedad (Sordillo y Streicher, 2002; Miglior et al., 2017). Sin embargo, esta estrategia de intensificación de la producción lechera ha generado una «presión» de selección en los animales, selección acompañada de un incremento sostenido de los eventos de salud. Estos últimos son de suma importancia para un sector en constante competitividad y de eficiencia productiva. En este sentido, la rentabilidad general y la salud de la vaca lechera son particularmente desafiantes durante el período de transición (Drackley, 1999; Ingvarsen y Andersen, 2000).

Durante este período la vaca lechera se ve afectada por diferentes factores estresantes (Grummer et al., 2004). Las adaptaciones endócrino-metabólicas que apoyan el inicio de la lactancia, un estado fisiológico de balance energético negativo (BEN), incrementos en la movilización de reservas corporales y el estrés oxidativo, son en su conjunto contribuyentes en el ascenso abrupto en el riesgo a desarrollar enfermedades (Goff, 2006). En este sentido, se ha documentado que aproximadamente durante las primeras semanas posparto, se desarrollan el 50% de los eventos sanitarios (LeBlanc, 2010), importante no solo desde una perspectiva de la rentabilidad económica de los sistemas, sino también en lo referente al bienestar animal (Bertoni et al., 2008). Contextualizando, Drackley (1999) ha argumentado que la biología durante el período de transición era la «frontera final» en lo que refiere a la comprensión de la vaca lechera.

Los cambios endócrino-metabólicos característicos del periparto da en consecuencia un sistema inmunitario deteriorado o desregulado (Esposito et al., 2014; Sordillo, 2016). En este sentido, Burvenich et al. (2003) han argumentado que las respuestas inmunes innatas y adaptativas se alteran durante el período de transición. Esta alteración en dichas respuestas constituye un estado de inmunosupresión que predispone al desarrollo de enfermedades (Burton et al., 2001; Ingvarsen et al., 2003). Entretanto, el desbalance energético se ha asociado con un descenso en el recuento sanguíneo de células inmunitarias como los neutrófilos y una disminución en la capacidad fagocítica (Hammon et al., 2006). Estas alteraciones funcionales se han relacionado fuertemente con trastornos de salud de la lactancia temprana, incluidos trastornos uterinos y mastitis (Cai et al., 1994; Kimura et al., 2002). Por otro lado, el estrés metabólico durante el período en torno al parto en el ganado lechero, ha sido ligado con los procesos inflamatorios (Sordillo y Aitken, 2009; Bradford et al., 2015). En las últimas décadas, la investigación ha destacado el papel de la inflamación en las enfermedades infecciosas y como se vincula fuertemente al desarrollo de enfermedades metabólicas y al agravamiento de ciertos eventos sanitarios como la mastitis (Bradford y Swartz, 2020). En este sentido, Mallard et al. (1998) han sugerido que los hallazgos biológicos mencionados no implican causalidad y efecto, sin embargo, sugieren una fuerte interacción entre el sistema endócrino-metabólico y el sistema inmunitario. Cabe subrayar, el deber pensar en el metabolismo y la inmunidad no como conceptos aislados, sino como sistemas integrados y fuertemente ligados sobre los eventos sanitarios en los rodeos lecheros.



## 2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

### 2.1 *Caracterización de la producción lechera en Uruguay*

En la última década la lechería uruguaya creció en torno al 30%, con tasas anuales en los últimos años del 7% (DIEA, 2019). Este marcado incremento se explica por un aumento productivo a nivel individual (litros producidos por vaca) y en menor medida por un incremento en la carga animal (Chilibroste et al., 2012; Fariña y Chilibroste, 2019). Esta tendencia ha generado que en las últimas dos décadas la remisión a plantas procesadoras de leche haya aumentado un 50%. A su vez, en el mismo período de tiempo, el área destinada a la lechería ha disminuido cerca del 60% y el número de productores remitentes en un 19% (DIEA, 2019). Uruguay presenta uno de los costos de producción de leche más bajos a nivel internacional, explicado mayoritariamente por su base pastoril (Chilibroste et al., 2011). Sin embargo, como es conocido, el consumo de materia seca (MS) se ve limitado cuando las pasturas son la única base nutricional del ganado lechero y por lo tanto, los animales no logran expresar su potencial genético (Kolver y Müller, 1998; Kennedy et al., 2003). En este sentido, en nuestros sistemas de producción, se ha reportado un desbalance estructural entre oferta y demanda de nutrientes, situación que involucra períodos de subnutrición del rodeo (Naya et al., 2002; Chilibroste et al., 2011).

Se ha demostrado que la intervención en la alimentación con niveles altos de suplementación en la lactancia temprana, presenta mejoras en los niveles de producción de leche (Broster et al., 1993; Bargo et al., 2002). Es por ello, que la dinámica de crecimiento de la lechería ha sido posible debido a cambios en el sistema de producción. Fariña y Chilibroste (2019) han indicado que estos cambios son principalmente en la alimentación, con incrementos significativos en el uso de concentrados y reservas forrajeras, derivando en sistemas con niveles crecientes de complejidad operativa.

En base a estos antecedentes, la intensificación de la producción lechera exige otro tipo de manejo productivo que trae consigo cambios en la salud de los animales, los cuales han sido seleccionados genéticamente y presionados para lograr mayores producciones (Miglior et al., 2017). Los eventos sanitarios representan un elemento importante de discusión para un sector rentable y sostenible. La vaca lechera en particular es susceptible a una mayor incidencia y severidad de enfermedades metabólicas e infecciosas durante el periparto, las cuales son especialmente problemáticas afectando en gran medida la eficiencia productiva de los rodeos.

### 2.2 *Período de transición: regulación endócrina del metabolismo*

El pasaje del estado de preñada no lactante al de no preñada lactante, expone a la vaca lechera a dramáticos cambios metabólicos (Drackley et al., 2005; LeBlanc, 2010), endócrinos (Laeger et al., 2013) e inmunológicos (Goff y Horst, 1997; Ingvarsen y Moyes, 2013). Estos cambios coinciden con un mayor riesgo de padecer enfermedades durante las dos primeras semanas posparto (Overton y Waldron, 2004; Ingvarsen, 2006). LeBlanc (2010) ha señalado que entre el 30 y el 50% de las vacas lecheras experimentan una enfermedad metabólica y/o infecciosa durante el período en torno al parto.

Esta problemática ha llevado al desarrollo del concepto de transición, el cual es definido como el período comprendido entre las tres semanas anteriores al parto y tres posteriores al mismo (Goff y Horst, 1997; Drackley, 1999). Durante este lapso de

tiempo, las vacas lecheras experimentan un incremento en las necesidades energéticas, las cuales comienzan con el crecimiento fetal en la gestación tardía y prosiguen durante las primeras semanas luego del parto debido a los requerimientos para la lactogénesis (Drackley, 1999, Meikle et al., 2013b). En el mismo estadio, disminuye el consumo de alimento, el cual puede situarse en un descenso del 30% en las últimas semanas preparto y proseguir durante el posparto temprano (Grummer, 1995; Bell et al., 1995b). El aumento en los requerimientos energéticos supera el consumo de alimento por parte de los animales (Bertoni et al., 2008), lo que Chilliard (1999) ha definido como una «subnutrición fisiológica». El repentino acrecentamiento de las necesidades energéticas durante el período de transición en la vaca lechera, conjuntamente con el descenso de la ingesta de alimento, da como resultado un estado de BEN (Grummer, 1995; Drackley, 1999; Goff, 2006). Rhoads et al. (2009) han señalado que este desbalance energético que ocurre durante el período de transición podría agravarse incluso por factores adicionales como el estrés o el manejo de los animales.

Para compensar la deficiencia en el suministro de energía característico durante este período, la vaca lechera tiene una capacidad sobresaliente para reorganizar su metabolismo. Bauman y Currie (1980) han propuesto utilizar el término «homeorhesis», para describir las adaptaciones coordinadas del metabolismo y de la partición de nutrientes por parte de los diferentes tejidos, y con el fin de acrecentar la disponibilidad de sustratos energéticos. El impulso homeorético para favorecer la producción de leche requiere de la energía almacenada en las reservas corporales (Bauman, 2000; Bauman et al., 2006). La movilización de las mismas, la cual puede situarse en una reducción del 60% de la grasa corporal (Tamminga et al., 1997; Chilliard, 1999), da como resultado cambios en los perfiles metabólicos sanguíneos (Herdt, 2000), más precisamente incrementos en las concentraciones séricas de ácidos grasos no esterificados (NEFA; Meikle et al., 2004; Cavestany et al., 2005-2009). Las concentraciones de estos metabolitos comienzan a aumentar dos a tres semanas preparto, alcanzando un máximo al parto o la primera semana después del mismo, procediendo a la movilización grasa y consecuente pérdida en la condición corporal (CC; Ingvartsen y Andersen, 2000). Este incremento se ha asociado con mayores niveles de transcripción hepática de enzimas reguladoras de la  $\beta$ -oxidación (Drackley et al., 2001; Carriquiry et al., 2010). El aumento de las demandas energéticas en conjunción con una baja disponibilidad de precursores glucogénicos, imposibilita la oxidación completa de los ácidos grasos provenientes de la movilización lipídica, los cuales son metabolizados a nivel hepático a cuerpos cetónicos como el  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB; Kuhla et al., 2016). Es menester aclarar, que los incrementos de BHB pueden deberse a niveles elevados de hidroxilación ruminal de butirato, proveniente del catabolismo de los hidratos de carbono dietarios (Kristensen, 2005). Los cuerpos cetónicos liberados por el hígado actúan como fuente alternativa de energía (Drackley et al., 2001), lo que implica que cierta concentración de estos compuestos a nivel plasmático es parte de una adaptación fisiológica normal a las deficiencias energéticas. Sin embargo, altas concentraciones de los mismos, marcando un excesivo desbalance energético, estarían asociadas con efectos perjudiciales hacia la salud y la producción de los animales (Gillund et al., 2001; Hammon et al., 2006; McArt et al., 2013).

Roche et al. (2009) han señalado que tanto las vacas con pobres depósitos de reservas corporales («sub-condicionadas»,  $CC < 3$ , en una escala de cinco puntos según Edmonson et al., 1989) o vacas con exceso de CC («sobre-condicionadas»,  $CC \geq 3,5$ ) durante el periparto, se asocian con incrementos en el riesgo a desarrollar eventos sanitarios. Por un lado, las vacas «sub-condicionadas», sufren de insuficiencias

energéticas y de precursores proteicos, necesarios para obtener rendimientos óptimos de producción y resistencia a las enfermedades (Heuer et al., 1999). Por el contrario, en los animales «sobre-condicionadas», el descenso en el consumo de alimento característico del periparto se exagera y da como resultado un desbalance energético más profundo, con incrementos en las concentraciones séricas de NEFA debido a una mayor lipomovilización (Roche et al., 2009-2015). Como se ha mencionado *ut supra*, los aumentos prolongados de NEFA durante el periparto representan un factor de riesgo importante para los trastornos de salud en la vaca lechera (Heuer et al., 1999).

El descenso en el consumo de alimento durante el período de transición, se ha asociado a bajas concentraciones séricas de colesterol, siendo este un buen indicador del balance energético y de la respuesta adaptativa al mismo (Herdt, 2000). Estas bajas concentraciones de colesterol alrededor del parto, se han vinculado con el incremento en el riesgo a desarrollar enfermedades (Sepúlveda et al., 2015). En este sentido, estudios recientes a nivel nacional, han indicado que el descenso de la colesterolemia al parto, resulta en un buen valor predictivo en la incidencia de metritis, retención de placenta y mastitis en vacas multíparas durante el posparto temprano (Ruprecht et al., 2018). Por otro lado, el descenso en el consumo en torno al parto implica disminución en las concentraciones séricas de metabolitos nitrogenados (proteína total-albúmina-globulinas), lo que se asocia con la lipomovilización de reservas corporales para compensar las mencionadas deficiencias (Cavestany et al., 2005-2009).

Como se ha mencionado, los últimos estados de gestación y los primeros estados de lactancia, generan en el animal grandes cambios desde el punto de vista endócrino-metabólico. Otro factor muy importante durante el período de transición es el relacionado con el metabolismo de los minerales, principalmente el del calcio. Horst et al. (1997) han propuesto que la disminución del calcio plasmático sobre el parto en la vaca lechera, es producto de un desequilibrio en los mecanismos homeostáticos en su regulación. El calcio se ha asociado con una disminución en la capacidad fagocítica de los neutrófilos, contribuyendo así a una inmunosupresión (Kehrli et al., 2006). En este sentido, Curtis et al. (1985) han relacionado la hipocalcemia puerperal con incrementos en la susceptibilidad a desarrollar enfermedades, tales como la metritis y mastitis.

La regulación del metabolismo durante el período de transición, está fuertemente controlada por cambios endócrinos que aseguran el reordenamiento de los nutrientes para favorecer la lactancia. Las concentraciones plasmáticas de la hormona de crecimiento (GH), secretada por la adenohipófisis, comienzan a incrementar durante las últimas semanas de gestación y se hacen máximas luego del parto (Kobayashi et al., 1999). La misma «apaga» el consumo de glucosa por parte de los tejidos periféricos y estimula su uso por parte de la glándula mamaria. Asimismo, atenúa la respuesta lipogénica de la insulina y estimula las señales  $\beta$ -adrenérgicas, favoreciendo así la lipólisis en el tejido adiposo (Lucy et al., 2001). Es durante este momento que se produce un desacople del eje somatotrófico, debido a una baja expresión de receptores de GH (GH-R) a nivel hepático, lo que se asocia con una reducción en la circulación de IGF-I (factor de crecimiento insulínico-I; Kobayashi et al., 1999; Lucy et al., 2001). A nivel nacional, Astessiano et al. (2012) demostraron experimentalmente una menor expresión de transcritos de GH-R e IGF-I durante el posparto temprano en vacas lecheras en sistema pastoril, descenso menos pronunciado en animales con suplementación energética. Esto conlleva a una reducción en la retroalimentación negativa sobre la GH por parte de la IGF-I, traduciéndose a mayores concentraciones de GH y favoreciendo así su actividad catabólica. Conviene subrayar que la insulina juega

un papel muy importante en la sensibilidad hepática a la GH y por lo tanto en el eje somatotrófico. La misma está disminuida en torno al parto (Reist et al., 2003; Meikle et al., 2004), acorde a las deficiencias energéticas en dicho período (Bertics et al., 1992). Una baja expresión de receptores de GH en el hígado, asociado a una reducción en la circulación de IGF-I e insulina, proporciona un ambiente endócrino que promueve la acción directa de la GH sobre el catabolismo periférico.

La leptina y adiponectina son dos hormonas metabólicas de interés en relación con el equilibrio energético, las cuales son secretadas por el tejido adiposo (Delavaud et al., 2000). La leptina está positivamente ligada con los depósitos de grasa y su concentración varía según el estado de reservas corporales (Ehrhardt et al., 2000; Wathes et al., 2007). Es así que los niveles de esta hormona disminuyen alrededor del parto, conjuntamente con la movilización y pérdida de dichas reservas corporales (Meikle et al., 2004; Cavestany et al., 2005). Debido a que la leptina influye negativamente en la ingesta de alimento, Ingvarsen y Boisclair (2001) han señalado que su descenso en el periparto podría catalogarse como estratégico, cesando su efecto inhibitorio sobre el apetito y generando un efecto positivo sobre el consumo, en un momento crítico de deficiencias energéticas. Por otro lado, la adiponectina, posee importantes funciones metabólicas, entre las que se encuentran la mejora de la sensibilidad a la insulina y la inhibición de la neoglucogénesis. Debido a que su concentración se encuentra disminuida durante el período de transición, se favorecería durante este período la síntesis de glucosa por parte del hígado y su posterior utilización por la glándula mamaria (Zhou et al., 2005; De Koster et al., 2017).

Se ha reconocido que el tejido adiposo secreta además otras moléculas bio-activas llamadas adipocinas o adipocitocinas, las cuales tienen un papel primordial sobre la regulación de varios procesos fisiológicos (por ejemplo, el factor de necrosis tumoral alfa; TNF- $\alpha$ ). El correcto y delicado equilibrio entre la expresión de adipocinas pro-inflamatorias (leptina, TNF- $\alpha$ ) y adipocinas anti-inflamatorias (adiponectina), es decisivo en el mantenimiento de la homeostasis endócrino-metabólica y del sistema inmune. Las adipocinas pro-inflamatorias, son un componente crítico del sistema inmune innato, las cuales incluyen factores celulares y solubles, involucrados en procesos como la lipólisis, resistencia periférica a la insulina, como también la estimulación en la síntesis hepática de proteínas de fase aguda positiva (pAPP) como la haptoglobina (Hotamisligil et al., 1993; Nightingale et al., 2015).

Las adaptaciones homeoréticas que sufre la vaca lechera en materia de partición de nutrientes durante el período de transición, son diferentes de acuerdo a la paridad. Es así que estudios nacionales han identificado un descenso más pronunciado en la CC en torno al parto en las vacas primíparas respecto a las múltíparas, consistente con una mayor movilización de reservas y un desbalance energético más pronunciado (Meikle et al., 2004; Cavestany et al., 2005). Las concentraciones plasmáticas de NEFA se incrementaron al parto tanto en vacas primíparas como múltíparas, pero en las primeras fue más pronunciado, consistente con la mayor movilización y pérdida de CC registrada. Rémond et al. (1991) han sugerido que esta implicancia biológica podría explicarse por los mayores requerimientos sobre las primíparas, las cuales prosiguen su crecimiento simultáneamente con las demandas para la lactogénesis. En este sentido, el estrés asociado a la primera lactancia, las menores tasas de consumo y el efecto de dominancia ejercido por las vacas múltíparas sobre las primíparas, podrían explicar las diferencias encontradas (Rémond et al., 1991; Grant y Albright, 2001). Estas diferencias registradas entre grupos de paridad se reflejan también en cambios en las

concentraciones hormonales (*i.e.* IGF-I e insulina). Taylor et al. (2004) y Wathes et al. (2007) han señalado que las concentraciones plasmáticas de IGF-I cercano al parto son superiores para las vacas primíparas con respecto a las múltiparas. Sin embargo, estudios nacionales han indicado cierta discrepancia con lo observado por los anteriores, indicando menores concentraciones de IGF-I e insulina en las vacas primíparas. Las diferencias propias de manejo entre los sistemas de confinamiento (Wathes et al., 2007) y sistemas pastoriles (Meikle et al., 2004), podrían explicar las divergencias anteriormente mencionadas.

En suma, las altas demandas energéticas durante el período de transición, colocan a la vaca lechera a grandes desafíos endócrino-metabólicos, lo que contribuye a un incremento en el riesgo de enfermedades metabólicas y/o infecciosas en dicho período. Wilson et al. (2004) demostraron que el número de primeros casos de mastitis clínica fue mayor durante la primera semana de lactancia en comparación con aquellos diagnosticados desde la segunda semana posparto. Así mismo, se ha reportado que las mastitis por coliformes durante este período presentan signos clínicos más severos en comparación con los eventos acaecidos en el resto del ciclo productivo (Shuster et al., 1996). Por otro lado, la capacidad de la vaca lechera para resistir el desarrollo de las enfermedades durante el período de transición está relacionada en parte con la eficiencia del sistema inmune.

### 2.3 Sistema inmune innato y adaptativo durante el período de transición

La comprensión general del funcionamiento del sistema inmune es esencial para dilucidar los mecanismos fisiopatológicos que subyacen a las respuestas del sistema inmune en la vaca lechera durante el período de transición.

Desde el punto de vista funcional, el sistema inmune se puede clasificar en un sistema de respuesta innato y en un sistema de respuesta adaptativo. El sistema inmune innato representa la primera línea de defensa del huésped, sistema preparado para reconocer y responder de inmediato durante las primeras etapas de la infección, respuesta que precede a la inmunidad adaptativa (Abbas et al., 2017). La inmunidad innata responde de la misma manera frente a diferentes estímulos, poseyendo una especificidad «relativamente» limitada, es decir, distingue estructuras comunes a grupos de microorganismos, pudiendo no distinguir diferencias más específicas entre ellos (Medzhitov y Janeway, 2000).

La defensa inmune innata se compone de barreras físicas como los epitelios, o más específicamente, el esfínter del pezón de la glándula mamaria, barreras químicas, como defensinas (lactoferrina-lactoperoxidasa) al igual que factores solubles o humorales, como proteínas del complemento, ficolinas, proteínas de fase aguda (APP) y citoquinas, todos los anteriores esenciales de la respuesta innata (Abbas et al., 2017). Por otro lado, esta inmunidad también está mediada por poblaciones de células inmunes innatas de origen mielóide, entre las que se destacan las células fagocíticas (monocitos, neutrófilos, células dendríticas) y granulocitos (mastocitos, basófilos, eosinófilos) y células de origen linfóide como las células naturales asesinas (NK; Riollot et al., 2000; Burvenich et al., 2003; Werling y Jungi, 2003).

Si bien la inmunidad innata generalmente es capaz de eliminar los patógenos de manera eficiente, esta erradicación inicial de la infección puede fallar debido, por ejemplo, a factores relacionados al huésped como la inmunosupresión o factores relacionados a la virulencia de los patógenos invasores (Netea et al., 2017). En esta situación, se activan

linfocitos y mecanismos efectores de la inmunidad adaptativa (inmunoglobulinas), lo que permite en etapas posteriores el reconocimiento y la eliminación específica del patógeno (Lippolis, 2008). Farber et al. (2016) han indicado que el establecimiento de la inmunidad adaptativa necesita de un par de semanas y es importante para la defensa del huésped durante las últimas fases de una infección y durante las subsecuentes. Esto debido a que las respuestas inmunes adaptativas reconocen con gran precisión los agentes patogénicos y por su capacidad de «memoria» y de responder más eficazmente a la reestimulación. La activación de la respuesta inmune adaptativa y la inducción de la memoria inmune por parte de los linfocitos, es dependiente del sistema inmune innato, en particular de las células presentadoras de antígenos, entre las que se destacan células mononucleares como monocitos, macrófagos tisulares y células dendríticas. En tal sentido, Cooper y Alder (2006) han indicado que los efectos posteriores de la activación linfocitaria, es en parte la amplificación de la respuesta innata como la fagocitosis.

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) son una población mixta de células inmunes consistentes principalmente en células linfoides y células de origen mieloide como monocitos y una pequeña cantidad de células dendríticas (Mann et al., 2019). Summers et al. (2010) han indicado que este grupo de células es particularmente interesante cuando se estudia el efecto del equilibrio de nutrientes y el balance energético sobre la funcionalidad del sistema inmune, máxime tratándose de células presentes en la primera línea de defensa del sistema inmune innato y partícipe del proceso inflamatorio como los monocitos y/o macrófagos tisulares.

El estado energético de las vacas lecheras está estrechamente relacionado con el mantenimiento de una función inmunológica adecuada y esto ligado fuertemente con el desarrollo de los eventos sanitarios (Sordillo, 2016). Como se ha señalado, los requerimientos energéticos varían considerablemente a lo largo del ciclo productivo, incrementándose durante el parto. Desde los trabajos de Kehrlí et al. (1989a) se ha demostrado que los cambios endócrino-metabólicos ocurridos durante el período de transición se traducen en una función inmune deteriorada o inmunosupresión. Como se ha mencionado, el desbalance energético durante el parto es crítico en materia de disfunción del sistema inmune. Sin embargo, la causalidad de esta disfunción inmunitaria es más compleja. Perkins et al. (2002) y Moyes et al. (2009) sometieron a vacas lecheras a una restricción alimentaria durante la lactancia establecida, lo que se tradujo a cambios mínimos en la función del sistema inmune. Estos estudios han sugerido que la biología de la inmunosupresión en la vaca lechera durante el período de transición es más compleja que la sola deficiencia de nutrientes. Los cambios endócrinos acaecidos durante el período es probablemente un factor crítico a influir en la capacidad funcional del sistema inmune.

Durante el período de transición el recuento a nivel sanguíneo de células inmunes, principalmente linfocitos, monocitos y neutrófilos se encuentran en descenso (Kehrlí y Goff, 1989b; Cai et al., 1994; Detilleux et al., 1995; Ingvarlsen y Moyes, 2015), en tanto los mecanismos fisiológicos responsables de esta alteración en el sistema inmune siguen siendo tema de discusión (Paape et al., 2002). Se ha señalado que este detrimento durante el parto está directamente asociado con los cambios bioquímicos procedentes de la movilización lipídica y el consecuente incremento en las concentraciones plasmáticas de NEFA y BHB en dicho período (Lacetera et al., 2004-2005; Hammon et al., 2006). En este sentido, estudios recientes a nivel nacional han revelado que concentraciones altas de NEFA previo al parto se correlacionan negativamente con el conteo de neutrófilos en el posparto temprano (Barca et al., 2020,

sin publicar). Por otro lado, se ha señalado que el acrecentamiento en las concentraciones plasmáticas de NEFA en torno al parto, generan una disminución en la proliferación de las células inmunes así como su viabilidad, rasgos indicativos de inmunosupresión o inmunidad deteriorada y riesgo de enfermedades (Scalia et al., 2006; Moyes et al., 2009; Ospina et al., 2010a,b). Del mismo modo, los glucocorticoides (*i.g.* cortisol), conocidos por su capacidad inmunosupresora, están elevados alrededor del parto, postulándose que pueden ser responsables en parte de la inmunosupresión transicional (Burton et al., 1995). En el mismo sentido, Weber et al. (2001) han indicado que las concentraciones elevadas de estradiol y progesterona en torno al parto pueden afectar la capacidad funcional y la proliferación y génesis de las células del sistema inmune.

Por otro lado, se ha documentado una alteración en la funcionalidad de las células constituyentes del sistema inmune, en particular las células del sistema inmune innato, durante el período de transición (Burvenich et al., 2003). Nonnecke et al. (2003) han sugerido que los cambios referidos a la funcionalidad del sistema inmune durante este periodo son propios de la lactogénesis y los cambios endócrino-metabólicos característicos de la misma. Estos cambios se han asociado, por ejemplo, con el descenso en la capacidad fagocítica de los neutrófilos (Hammon et al., 2006; Ingvarsen y Moyes, 2015) y esta con una mayor susceptibilidad a desarrollar enfermedades (Cai et al., 1994; Burton et al., 2001; Kimura et al., 2002; Ingvarsen et al., 2003). Kehrlí et al. (2006) ha indicado que la deficiencia en la migración aleatoria, como la disminución en la expresión de moléculas de adhesión a nivel endotelial, contribuyen a las alteraciones en la fagocitosis anteriormente mencionadas. Por otro lado, el incremento en las demandas energéticas durante el período de transición genera un considerable ascenso en los requerimientos de oxígeno a nivel celular, dando como resultado una producción aumentada de especies reactivas de oxígeno (ROS; Sordillo, 2016; Spears y Weiss, 2008). Bernabucci et al. (2005) han señalado que la excesiva movilización lipídica da como resultado una deficiencia en el potencial reductor («antioxidante»), generando un estado de estrés oxidativo propio del período transicional, con la consecuente pérdida de función de las células inmunes. Grum et al. (2002) han indicado por otro lado, que los incrementos de ROS en el posparto temprano, podrían deberse al ascenso en la oxidación peroxisomal, una adaptación fisiológica y vía alternativa para mejorar la capacidad oxidativa de los ácidos grasos provenientes de la lipomovilización. Según estos autores, este tipo de oxidación contribuye en mayor medida a la producción de ROS que la oxidación mitocondrial. Este estrés oxidativo es un factor subyacente significativo de las respuestas inmunes e inflamatorias disfuncionales que pueden aumentar la susceptibilidad a enfermedades en la vaca lechera durante el periparto (Rinaldi et al., 2007; Mehrzad et al., 2008). En tal sentido, Ster et al. (2012) han indicado que las estrategias que eviten movilizaciones de reservas abruptas durante el período de transición podrían llegar a aplacar la inmunosupresión y la inflamación exacerbada en el posparto temprano.

#### 2.4 Inflamación durante el período de transición

En la última década, la inflamación ha sido tema de discusión y tratada como un aspecto emergente y clave en la biología de la vaca lechera durante el período de transición. Como se ha mencionado en secciones anteriores, el estrés metabólico durante este período en los animales se ha asociado con procesos inflamatorios exacerbados (Esposito et al., 2014), y esto con el consecuente incremento en el riesgo a desarrollar

enfermedades, como los trastornos uterinos y mastitis (McDougall et al., 2009; de Vliegher et al., 2012; Bradford et al., 2015).

Cabe destacar que existe una respuesta inflamatoria sistémica y fisiológica dentro del útero a medida que se aproxima el parto (Trevisi y Bertoni, 2010; Trevisi et al., 2012), inflamación que autores como Sheldon et al. (2020) la han denominado reparadora y participe clave de la involución uterina. Esta regeneración y remodelación del útero se traduce en incrementos de citoquinas pro-inflamatorias, principalmente interleukina-8 (IL-8) e interleukina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), las cuales presentan una regulación positiva a nivel hepático en la síntesis de pAPP, como SAA1 (amiloide sérico-A1), y de TNF- $\alpha$ , por parte de los hepatocitos y células de Kupffer (sistema fagocítico mononuclear), respectivamente. El grupo de proteínas con capacidad pro-inflamatoria mencionadas anteriormente, tienen efectos depresores del apetito e incrementos del gasto energético, esto último principalmente producto del ascenso en las concentraciones séricas de TNF- $\alpha$  (Loor et al., 2005). Esta última es una de las citoquinas más importantes involucradas en el inicio y desarrollo de la respuesta de fase aguda, pudiendo actuar de manera parácrina a nivel hepático y provocar una regulación positiva potente de pAPP, como la ya mencionada SAA1 (Huzzey et al., 2009). En este sentido, Loor et al. (2005) han indicado que la expresión hepática de pAPP sigue un patrón de incremento similar al observado por TNF- $\alpha$ . La depresión en el consumo de alimento da como resultado un desbalance energético con incrementos lipolíticos de las reservas corporales y consecuente incremento en las concentraciones plasmáticas de NEFA, contribuyendo a agravar, y como se ha mencionado en secciones anteriores, una situación de desbalance energético fisiológico durante el período de transición (Chilliard, 1999; Kushibiki et al., 2003; Bionaz et al., 2007). Si bien la tasa lipolítica comienza a descender en etapas subsecuentes durante la lactancia, Hachenberg et al. (2007) han indicado que el mantenimiento de la misma se relaciona a procesos inflamatorios exacerbados durante el posparto. En este sentido, se ha documentado que altas tasas de movilización de reservas, genera en las mismas un estado de inflamación desregulado y sostenido. Esto se explica por un incremento en la infiltración de macrófagos dentro del tejido adiposo subcutáneo, con la consecuente liberación de citoquinas pro-inflamatorias, principalmente TNF- $\alpha$ , su efecto precursor sobre la hipoinsulinemia subsecuente y posterior ascenso en las concentraciones plasmáticas de NEFA (Newman et al., 2019). Loor et al. (2005) han señalado que la dinámica del metabolismo energético y más específicamente la dinámica hepática durante el período de transición, probablemente varíe según la naturaleza e intensidad de la respuesta inflamatoria. Esta respuesta parece ser una señal clave que inicia el catabolismo del tejido adiposo y muscular (Kushibiki et al., 2003). Es por ello que las desregulaciones en la movilización de reservas con el consecuente incremento en las concentraciones plasmáticas de NEFA y los procesos pro-inflamatorios exacerbados, son factores claves que afectan las funciones biológicas y la gravedad e incidencia de enfermedades inflamatorias en la vaca lechera durante la transición.

La mastitis es una de las enfermedades inflamatorias más prevalentes y con mayores costos que afecta a los sistemas de producción lechera (Barkema et al., 1998; Bradley y Green, 2001), costos atribuibles en disminución de la producción y calidad de la leche, incremento en las tasas de descarte, costos por tratamientos y efectos ocultos principalmente sobre parámetros reproductivos (Hertl et al., 2010; Ruegg, 2017). Esta patología es causada mayoritariamente por infecciones intra-mamarias (Bannerman, 2009), de las cuales, según Gröhn et al. (2004), el 40% se atribuyen a infecciones bacterianas gramnegativas, en su mayoría coliformes. La *Escherichia coli* es el agente



patógeno gramnegativo más prevalente de las infecciones intra-mamarias, causando mastitis clínica de mayor gravedad y mortalidad que otros agentes causales (Bannerman, 2009; Quesnell et al., 2012). La capacidad de la vaca lechera para resistir a las mismas, esta mediada en parte por la respuesta inmune en dirección hacia los microorganismos invasores y en parte por diferentes factores de virulencia de los patógenos partícipes de dichas infecciones (Burvenich et al., 2003).

En respuesta a las mismas, los componentes de la inmunidad innata y adaptativa inician respuestas coordinadas con el fin de generar la inflamación y mantener la homeostasis interna (Medzhitov, 2008). La inflamación desencadenada por patógenos gramnegativos, se inicia por señalización del receptor tipo toll-4 (TLR-4), expresado en la superficie de células epiteliales de la glándula mamaria (MEC), células de origen mieloide (monocitos, macrófagos tisulares, células dendríticas), entre otras, el cual reconoce patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP; Poltorak et al., 1998; Abbas et al., 2017). El lipopolisacárido (LPS) es un componente de la membrana externa de las bacterias gramnegativas, componente patogénico principal que inicia la respuesta inflamatoria local y la respuesta sistémica de fase aguda (Bannerman, 2009; Lippolis et al., 2014). En tal sentido, Hirschfeld et al. (2001) y Doherty et al. (2013) han indicado que la proteína A de la molécula de LPS es el ligando relevante para el TLR-4. Entretanto, Mehrzad et al. (2008) han concluido que la capacidad de liberación de LPS por parte de las bacterias gramnegativas durante las infecciones intra-mamarias es crucial en el desarrollo de la respuesta inflamatoria y la enfermedad clínica. La transducción de señales a través de TLR-4 conduce al reclutamiento de proteínas adaptadoras (MyD88) y finalmente en translocación del factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B, induciendo la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Akira et al., 2006). En tal sentido, Schukken et al. (2011) han indicado que varias citoquinas están reguladas por aumento de LPS de manera dependiente de NF- $\kappa$ B. Los efectos biológicos inducidos por LPS están mediados principalmente por citoquinas pro-inflamatorias, principalmente TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e interleukina 6 (IL-6), producidas a nivel transcripcional mayoritariamente por fagocitos mononucleares (monocitos). Sordillo y Streicher (2002) han indicado que el TNF- $\alpha$ , liberado por monocitos y macrófagos tisulares, se encuentra entre los primeros mediadores inflamatorios que aparecen en respuesta a la infección por microorganismos gramnegativos. Entretanto, Elazar et al. (2010) demostraron que la producción de la mencionada citoquina es la señal fundacional de la respuesta inflamatoria que resulta posteriormente en el reclutamiento de neutrófilos. El incremento de citoquinas pro-inflamatorias luego de la inducción por LPS provoca la migración de polimorfonucleados (PMN), principalmente neutrófilos al sitio de infección, los cuales proceden a la fagocitosis y al control de la infección, proporcionando una defensa antimicrobiana esencial contra las infecciones intra-mamarias (Bannerman et al., 2004; Schukken et al., 2011).

En referencia a lo anteriormente explicitado, Pomeroy et al. (2015) desarrollaron un modelo *in vitro* para estudiar la funcionalidad de las células dendríticas derivadas de monocitos (mo-DC), un subconjunto de células pertenecientes al grupo de las PBMC, demostrando su papel en la direccionalidad del sistema inmune durante la gestación tardía y el posparto temprano. En este sentido, los mencionados demostraron que las mo-DC obtenidas de vacas durante el posparto temprano presentaban una reducción en la producción de citoquinas anti-inflamatorias/regulatorias y una mayor señalización hacia una respuesta pro-inflamatorias, respuesta influenciada por la activación de interferón-gamma (IFN $\gamma$ ) e interleukina 12 (IL-12; Pomeroy et al., 2015). Resultados similares fueron descritos con anterioridad por Collins et al. (1999) donde reportaron

que la producción de IFN $\gamma$ , inducida por IL-12 estaba en ascenso en vacas lecheras durante el posparto temprano y con el subsecuente desarrollo de la respuesta pro-inflamatoria.

Esta respuesta inflamatoria es fundamental para el control del patógeno, aunque por otro lado, puede generar lesiones a nivel del tejido epitelial mamario con el consecuente incremento en la severidad de las mastitis por coliformes (endotoxemia) y disminución de la producción de leche, principalmente a inicio de lactancia (Sordillo et al., 1995; Schukken et al., 2011). Es por ello que es necesario que el proceso inflamatorio sea controlado y de conclusión rápida, luego de la eliminación del patógeno (Banchereau et al., 2012), implicancia biológica meramente difícil en la vaca lechera durante el posparto temprano debido a los cambios endocrino-metabólicos propios del mismo (Bradford et al., 2015).

*En resumen, teniendo en cuenta la información disponible respecto del impacto del balance energético negativo durante el parto sobre el sistema inmune, y que no hemos encontrado estudios que estudien el efecto de la paridad en estas variables en condiciones pastoriles, se propone caracterizar el recuento de células de la inmunidad innata y adaptativa y su asociación con perfiles endócrino-metabólicos en vacas lecheras primíparas y multíparas, en sistema mixto de alimentación, durante el período de transición. Por otro lado, si bien existen estudios in vitro respecto a la funcionalidad de las células mononucleares de sangre periférica frente a marcadores del balance energético negativo, no hemos encontrado reportes que estudien si la etapa de lactancia afecta esta funcionalidad en vacas lecheras.*

### 3. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA

La presión de la selección a favor del aumento de la producción de leche, ha modificado el metabolismo de la vaca lechera y el flujo de nutrientes a órganos y tejidos. La partición de nutrientes favoreciendo el flujo hacia la glándula mamaria, provoca en la vaca un estado de desbalance energético, evidenciado mayoritariamente durante el período de transición (Bauman y Currie, 1980). Este último es un momento fisiológicamente desafiante en el ganado lechero, debido a los profundos cambios endocrino-metabólicos durante dicho período, cambios influenciados directamente por los requerimientos de energía para el crecimiento fetal y el inicio de la lactancia y la depresión en la ingesta voluntaria de alimento, dando como resultado un estado fisiológico de BEN (Chilliard, 1999), desbalance más notorio y profundo en el posparto temprano (Newman et al., 2019). La compensación sobre la insuficiencia energética genera la lipólisis y consecuente movilización de reservas corporales, evidenciada por el incremento en las concentraciones plasmáticas de NEFA (Bauman y Currie, 1980). Esto genera cambios dramáticos en los perfiles endócrino-metabólicos durante el período de transición, regulando aspectos de la respuesta inmune innata y adaptativa (Burvenich et al., 2007, Sordillo, 2016). Se ha demostrado que las altas concentraciones de NEFA en el posparto temprano, generan efectos perjudiciales sobre parámetros inmunológicos como el descenso en la tasa fagocítica (Hoeben et al., 2000; Vangroenweghe et al., 2005; Rinaldi et al., 2007; Ingvarstsen y Moyes, 2013). Por otro lado, es durante el período de transición donde se desarrolla un detrimento en el recuento a nivel sanguíneo de células inmunes, principalmente linfocitos, monocitos y neutrófilos (Kehrli y Goff, 1989b; Cai et al., 1994; Detilleux et al., 1995; Ingvarstsen y Moyes, 2015). Entretanto, la lipólisis en dicho período, está relacionada con la disfunción en las señales inflamatorias, hallazgo biológico comúnmente observado en vacas lecheras en el posparto conjuntamente durante el estrés metabólico. Incluso, Espósito et al. (2014) han propuesto que las respuestas inmunes desreguladas y más precisamente los procesos inflamatorios, son el eslabón perdido de la patobiología del incremento en la presentación de trastornos de salud en la vaca lechera durante el posparto temprano.

Para estudiar estos mecanismos descritos anteriormente, hemos planteado dos modelos experimentales en vacas lecheras durante el período de transición. Uno de ellos (experimento I) fue diseñado para describir los cambios endócrino-metabólicos y sobre el recuento de células del sistema inmune innato y adaptativo en vacas lecheras durante el período de transición y evaluar el efecto de la categoría animal sobre dichos parámetros. Por otro lado, con la finalidad de observar la respuesta pro-inflamatoria en vacas lecheras en diferentes etapas de lactancia, desarrollamos un modelo *in vitro* (experimento II) para estudiar la respuesta en términos de producción de TNF- $\alpha$  por parte de las PBMC de vacas lecheras multíparas no gestantes durante la lactancia temprana y lactancia media. Para ello se empleó una cepa de *E. coli* irradiada con rayos UV obtenida de una caso clínico de mastitis bovina (Dogan et al., 2006) y utilizada para desafíos intra-mamarios (Quesnell et al., 2012; Gurjar et al., 2013; Sipka et al., 2013).

## 4. HIPÓTESIS

El entono endócrino-metabólico modifica el recuento total y diferencial de leucocitos a nivel sanguíneo durante el período periparto en la vaca lechera, independientemente de la categoría animal (experimento I).

La producción de TNF- $\alpha$  por parte de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) es superior en vacas en lactancia temprana *vs* lactancia media. En tanto, el ambiente endócrino-metabólico en el que las células sean co-cultivadas, tiene un impacto en dicha respuesta (experimento II).

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Contribuir al entendimiento de la interacción entre el sistema endócrino, metabólico e inmune en vacas lecheras, bajo un sistema mixto de alimentación, durante el período periparto.

### 5.2 Objetivos específicos

- 1) Describir los cambios endócrino-metabólicos y el recuento de células de la línea blanca, durante el período periparto, en vacas Holstein-Friesian bajo un sistema mixto de alimentación (experimento I).
- 2) Evaluar el efecto de la paridad (primíparas *vs* multíparas) sobre el perfil endócrino-metabólicos y el recuento de leucocitos, durante el período periparto (experimento I).
- 3) Determinar la concentración de TNF- $\alpha$  luego de la estimulación *in vitro* de las PBMC con *E. coli* en vacas en lactancia temprana y media (experimento II).
- 4) Determinar la relevancia del entorno endócrino-metabólico en el que las células mononucleares son co-cultivadas (experimento II).

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Localización y período de estudio

Ambos experimentos (experimento I y II), los cuales fueron tratados como independientes, se llevaron a cabo en un tambo comercial en San José, Uruguay (34°S-57°W), utilizando vacas Holstein-Friesian de un sistema mixto de producción de leche. El experimento I se realizó desde el 26 de abril al 21 de agosto de 2018, mientras que el experimento II fue realizado desde el 1 al 13 de octubre de 2017.

Los protocolos experimentales fueron evaluados y aprobados por el Comité Honorario para la Experimentación Animal (CHEA), Universidad de la República, Montevideo, Uruguay (expediente número 598/17).

### 6.2 Caracterización del predio

El predio comercial presentó un sistema mixto de alimentación, donde la dieta estuvo compuesta por 70% pastura y 30% concentrado. Las categorías animales (primípara vs múltiparas) fueron manejadas en diferentes lotes, en donde la estrategia de alimentación durante el desarrollo experimental, fue de doble pastoreo (6:00-11:30 AM y 6:00-11:30 PM), en franjas diarias de alfalfa (*Medicago sativa*), avena (*Avena sativa*) y trébol rojo (*Trifolium pratense*), con una oferta de forraje de aproximadamente 40 kg MS/vaca/día. Previo al ordeño, en encierro, los animales fueron suplementados con concentrados a base de grano y forraje conservado (ensilaje, fardos o silopacks), acorde a los requerimientos necesarios para vacas en lactancia (NRC, 2001). Las vacas fueron ordeñadas dos veces al día y presentaron un rendimiento de leche aproximado de 8300-8700 kg por lactancia. Durante el parto (-30 días previos al mismo) los animales fueron manejados en conjunto (primíparas y múltiparas) en un potrero con sombra y agua *ad libitum* y alimentados con ración totalmente mezclada (TMR), dos veces al día (12 kg MS/vaca/día), y suplementación con sales aniónicas en comederos compartidos. El establecimiento presentó registros de enfermedades de cada uno de los animales, los cuales fueron monitoreados diariamente y registrados en el software de gestión de datos DairyComp® (Valley Agricultural Software, Tulare, CA, USA).

### 6.3 Experimento I

#### 6.3.1 *Animales y diseño experimental*

Un subconjunto de vacas Holstein-Friesian primíparas ( $23,4 \pm 0,8$  meses; L1, n= 16) y múltiparas (2 - 5 lactancias; L2, n= 16) con fechas de parto cercanas y sin registro de enfermedades (*i.e.* mastitis, enfermedades metabólicas, reproductivas) dentro de los 30 días previos al inicio del experimento y durante todo el ensayo, fueron seleccionadas e incluidas dentro del mismo. La estrategia de muestro, para determinar el perfil endócrino-metabólico, y en términos de conteo de leucocitos, fue la de cuatro puntos muestrales; a los  $-45 \pm 4,8$ ;  $-10 \pm 4,6$ ;  $8 \pm 1,3$  y  $45 \pm 6,7$  días respecto al parto.

Se recolectó una muestra de sangre mediante venopunción de la vena coccígea en tubos estériles con gel acelerador de la coagulación (8,5 mL - Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Las muestras fueron centrifugadas a 3000 x g por 20 min y el suero fue almacenado a -20°C hasta su posterior análisis de metabolitos y hormonas en el

Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal, Facultad de Veterinaria, Uruguay. Se recolectó una segunda muestra en tubo estéril K2-EDTA de 6,5 mL (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), la cual fue enviada en el día y refrigerada al Laboratorio de Análisis Clínicos, Facultad de Veterinaria, Uruguay, para determinar el conteo total y diferencial de células blancas.

Se realizó un seguimiento, diagnóstico y registro de los eventos clínicos de cada uno de los animales durante el transcurso del experimento siguiendo determinados protocolos. Se realizó diagnóstico de mastitis clínica, retención de placenta, metritis, endometritis, laminitis y desordenes metabólicos (hipocalcemia clínica, cetosis clínica y desplazamiento de abomaso). Los animales con algún evento clínico fueron excluidos del ensayo. En cada uno de los momentos muestrales se tomó CC, determinada siempre por el mismo observador, utilizando una escala de 5 puntos (1-flaca, 5-gorda, Edmonson et al., 1989).

### 6.3.2 *Determinación de metabolitos*

Las variables bioquímicas se determinaron por espectrofotometría mediante analizador automático; A25 (© Biosystems S.A. Barcelona, Spain), con la utilización de kits dedicados en el caso de colesterol, proteína total, albúmina y calcio. Para la determinación de NEFA se utilizó reactivo (Wako-NEFA HR, Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) y para BHB (Randox Laboratories Ltd., Diamond Road, Crumlin, Country Antrim, United Kingdom). Para todos los casos el coeficiente de variación (CV) inter-ensayo de los sueros control comercial fue  $\leq 10\%$ .

### 6.3.3 *Ensayos hormonales*

Las concentraciones de insulina e IGF-I se determinaron mediante ensayos inmunoradiométricos (IRMA) en fase sólida utilizando kits comerciales (Diasource Immuno Assays S.A., Louvain la Neuve-Belgium) e (IGF-I-RIACT Cisbio Bioassays International, Codolet, France) respectivamente. Para IGF-I, la sensibilidad del ensayo fue de 0,7 ng/mL y el CV intra-ensayo para el control 1 (48 ng/mL) fue de 4,8 % y para el control 2 (360 ng/mL) fue de 8,4 %. La sensibilidad del ensayo de insulina fue de 1,8 ng/mL y el CV intra-ensayo para el control 1 (17,3 ng/mL) fue de 9,4%.

La leptina y adiponectina fueron determinadas por radioinmunoanálisis (RIA), en fase líquida, previamente descrito por Raddatz et al. (2008) con kits comerciales (Millipore Corporation, Missouri, USA). La sensibilidad para el ensayo de leptina fue de 1,9 ng/mL y el CV intra-ensayo para el control 1 (38,5 ng/mL) fue de 18,9%. Para adiponectina, la sensibilidad del ensayo fue de 7,1 ng/mL y el CV intra-ensayo para el control 1 (65 ng/mL) fue de 5,8%.

### 6.3.4 *Conteo total y diferencial de leucocitos*

El conteo total de leucocitos se determinó mediante hemo-contador automático (Mythic™ 18 Vet, Orphée, Geneva, Switzerland). El conteo diferencial de leucocitos (neutrófilos, linfocitos, monocitos) y evaluación morfológica, fue determinado mediante frotis o extendido sanguíneo con la utilización de la tinción May-Grünwald Giemsa y posterior visualización en microscopio con objetivo de inmersión (Olympus microscope cx 20i, Olympus Corporation, Tokyo, Japan).

### 6.3.5 Producción de leche

La producción de leche se registró individualmente, en ambos turnos de ordeño, a los  $13 \pm 8,9$ ;  $45 \pm 12,7$  y  $76 \pm 11,6$  días en lactancia, mediante medidor automático (DemaTrón 70, GEA Farm Technology, Düsseldorf, Germany).

## 6.4 Experimento II

### 6.4.1 Animales y diseño experimental

Se seleccionaron 16 vacas entre 2 y 5 lactancias (vacas multíparas) no gestantes. La sangre periférica y el suero sanguíneo se recogieron mediante venopunción de la vena coccígea a 8 vacas a los  $14 \pm 4$  (media  $\pm$  error estándar) días posparto, que se denominó 'grupo de lactancia temprana' (LT) y a 8 vacas a los  $123 \pm 31$  días posparto, que se denominó 'grupo de lactancia media' (LM). Los animales estuvieron sin registro de enfermedades (*i.e.* mastitis, enfermedades metabólicas, reproductivas) dentro de los 30 días previos a la toma de muestras.

Se tomaron muestras de sangre en tubo estéril con gel acelerador de la coagulación, tubos que contenían K2-EDTA y tubos de suero de vidrio sin aditivo (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), para la determinación de metabolitos, hormonas y para el desafío *in vitro* con *E. coli*, respectivamente. Las muestras se pusieron en hielo y se transportaron inmediatamente al laboratorio y se procesaron en el Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal y Laboratorio de Inmunología, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay.

La determinación de metabolitos fue llevada a cabo bajo la misma metodología descrita para el experimento I (sección 6.3.2).

### 6.4.2 Ensayos hormonales

Las concentraciones hormonales fueron determinadas mediante los mismos ensayos y utilizando los kits comerciales descritos previamente en la sección 6.3.3 (ensayos hormonales-experimento I).

Para IGF-I, la sensibilidad del ensayo fue de 0,4 ng/mL y el CV intra-ensayo para el control 1 (48 ng/mL) fue de 1,5%. La sensibilidad del ensayo de insulina fue de 2,1 ng/mL y el CV intra-ensayo para el control 1 (17,3 ng/mL) fue de 5,8%. La sensibilidad para el ensayo de leptina fue de 5,1 ng/mL y el CV intra-ensayo para el control 1 (31 ng/mL) fue de 7,2%. Para adiponectina, la sensibilidad del ensayo fue de 2,8 ng/mL y el CV intra-ensayo para el control 1 (11,8 ng/mL) fue de 10,8%, en tanto para el control 2 (82 ng/mL) fue de 3,5%.

### 6.4.3 Aislamiento de las células mononucleares

Se aislaron las PBMC de una proporción diluida de sangre entera y fresca 1:1 en PBS estéril (Life Technology, Grand Island, NY, USA), mediante centrifugación en gradiente de densidad (400-450 x g, 30 min, 18-20°C) con medio de separación de linfocitos (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Germany), previamente descrito por Pomeroy et al. (2015). Las PBMC se aislaron de la interfase y se agruparon. Los glóbulos rojos restantes se lisaron con una solución de NaCl hiposmótica y se lavaron una vez más en PBS después de la eritrólisis. Las células mononucleares se contaron y

se determinó su viabilidad mediante la utilización del colorante trypan-blue y se resuspendieron en medio de diferenciación (RPMI completo libre de fenol con suplemento de L-glutamina, Life Technology, Grand Island, NY, USA). Luego se colocaron en placas de cultivo de tejido de 48 pocillos a  $6,0 \times 10^5$  células en 750  $\mu$ l de RPMI por pocillo. Las células se cultivaron con suero autólogo (SA) al 10% y por otro lado con suero fetal bovino (SFB) inactivado (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Germany) y se dejaron aclimatar durante 24 hs (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). El SFB presentó una concentración de NEFA, BHB, colesterol, proteína total, albumina y calcio de 1,07 mmol/L, 0,02 mmol/L, 0,7 mmol/L, 39,2 g/L, 31,4 g/L y 2,36 mmol/L, respectivamente.

#### 6.4.4 *Maduración de las PBMC con E. coli irradiada con UV*

Después de la aclimatación, se contaron las células y se indujeron mediante estimulación bacteriana mediante la adición de *E. coli* ECC-Z irradiada con UV en una MOI (Multiplicidad de infección) de 10 (Dogan et al., 2006; Cavatorta et al., 2009). Los tiempos de incubación fueron los siguientes: 0, 0,5, 1, 2, 4, 8 y 24 hs, y los cultivos sin estimulación bacteriana se consideraron como controles negativos. El sobrenadante del cultivo celular se recogió y se almacenó a -80°C hasta un posterior análisis de TNF- $\alpha$  por ELISA.

#### 6.4.5 *Medición de TNF- $\alpha$ mediante kit ELISA*

Las concentraciones de TNF- $\alpha$  en el sobrenadante de los cultivos se analizaron con un kit de ELISA (Thermo Fisher, Vantaa, Finland) validado para su uso en bovinos. Los procedimientos se realizaron de acuerdo con las pautas proporcionadas por los fabricantes. Las lecturas de absorbancia se realizaron en un lector automático de placas de microtitulación (Multiskan EX, Thermo Fischer Scientific, Vantaa, Finland) con un filtro de 450-560 nm. Todos los estándares y muestras se analizaron por duplicado. El resultado se calculó con una curva estándar. Los coeficientes de variación entre e intra-enayos para TNF- $\alpha$  fueron  $< 12$  y  $< 10\%$ , respectivamente.

### 6.5 Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando un programa de análisis estadístico SAS (SAS Institute Inc. 2018. SAS® University Edition, Cary, North Carolina, USA).

La normalidad de los datos se verificó mediante el procedimiento Univariado de SAS. Las variables no distribuidas normalmente se transformaron a  $\log_{10}$ , para lograr una distribución normal.

Para el experimento I, las concentraciones de metabolitos, hormonas, leucocitos, condición corporal y producción de leche, se analizaron mediante un modelo de regresión lineal mixto (Proc Mixed SAS), donde la paridad, período e interacción paridad x período, fueron incluidos como efectos fijos y el animal como efecto aleatorio. La fecha de parto fue incluida como covariable.

Para el experimento II, las concentraciones de metabolitos y hormonas se analizaron mediante un modelo de regresión lineal mixto (Proc Mixed SAS), donde el grupo de lactancia fue incluido como efecto fijo y el animal como efecto aleatorio. Las concentraciones de TNF- $\alpha$  en los sobrenadantes de los cultivos celulares se analizaron mediante un modelo de regresión lineal mixto (Proc Mixed SAS), usando como efectos fijos el grupo (lactancia temprana vs media), suero (suero autólogo vs suero fetal



bovino), tiempo (0, 0,5, 1, 2, 4, 8 y 24 hs) e interacción grupo x suero x tiempo, y el animal como efecto aleatorio.

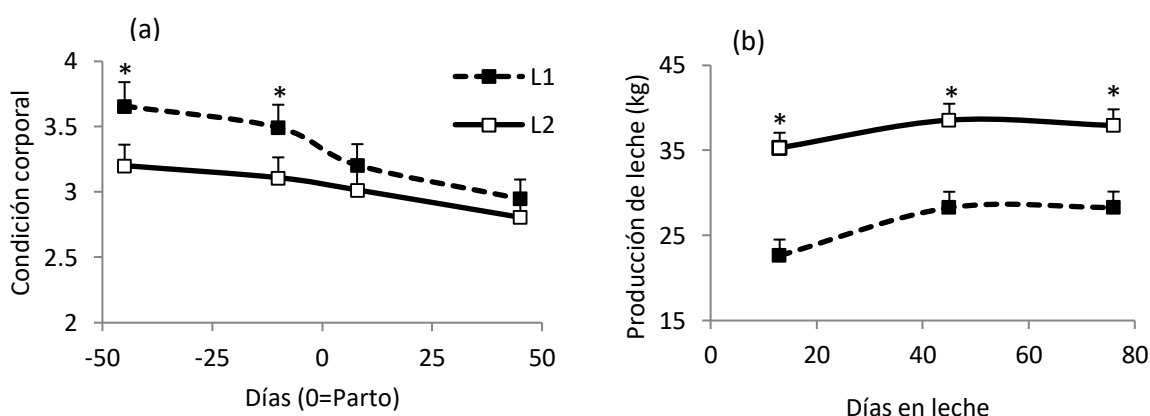
Se utilizó el procedimiento de Kenward-Rogers para ajustar el grado del denominador de libertad. Se realizaron pruebas de Tukey-Kramer para la comparación de las medias, las cuales se reportaron con su respectivo error estándar (media  $\pm$  error) y fueron consideradas significativamente diferentes cuando  $P \leq 0,05$  y tendencia cuando  $0,05 < P \leq 0,10$ . Las correlaciones entre las variables fueron analizadas mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 *Experimento I*

#### 7.1.1 *Condición corporal y producción de leche*

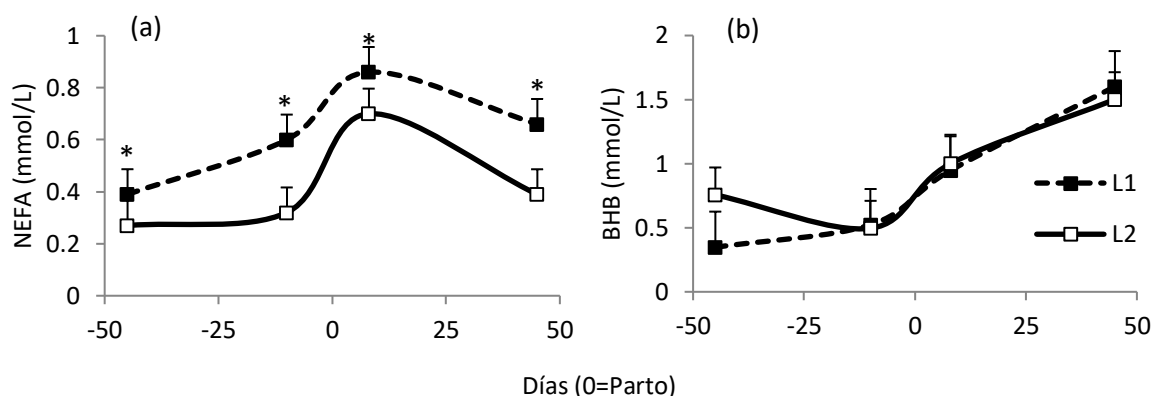
La evolución de la condición corporal fue afectada por la categoría animal, los días relativos al parto, y la interacción entre ambos efectos tendió a ser significativa (Tabla 1). Durante el preparto, la categoría primípara presentó mayor condición corporal con respecto a la categoría múltipara (Figura 1-a) y una pérdida de condición corporal más pronunciada durante la lactancia temprana (Figura 1-a). La producción de leche (Figura 1-b), fue superior en la categoría múltipara con respecto a la categoría primípara (Tabla 1).



**Figura 1.** Evolución de (a) la condición corporal (media ± error) y (b) producción de leche (kg), en vacas primíparas (L1, n= 16) y en vacas múltiparas (L2, n= 16), bajo un sistema mixto de alimentación. Las diferencias entre grupos de paridad se determinaron mediante medidas repetidas con las pruebas de Tukey-Kramer indicadas con un asterisco (\*)  $P \leq 0,05$ .

#### 7.1.2 *Concentraciones de ácidos grasos no esterificados y $\beta$ -hidroxibutirato*

El aumento observado en las concentraciones de NEFA fue superior para la categoría primípara, con respecto a la categoría múltipara (Figura 2-a, Tabla 1). Las concentraciones de NEFA, comenzaron a incrementar antes del parto en ambas categorías, alcanzando concentraciones máximas en el primer muestreo luego del parto (Figura 2-a). Las concentraciones de BHB fueron bajas durante el preparto, comenzando su ascenso al momento del parto, ascenso que se mantuvo durante el posparto (Figura 2-b). No se encontró efecto de paridad sobre las concentraciones de BHB (Tabla 1).



**Figura 2.** Perfiles en las concentraciones séricas (media  $\pm$  error) de (a) NEFA (mmol/L) y (b) BHB (mmol/L), en vacas primíparas (L1) y vacas múltíparas (L2). Los asteriscos (\*) indican diferencias en  $P \leq 0,05$ .

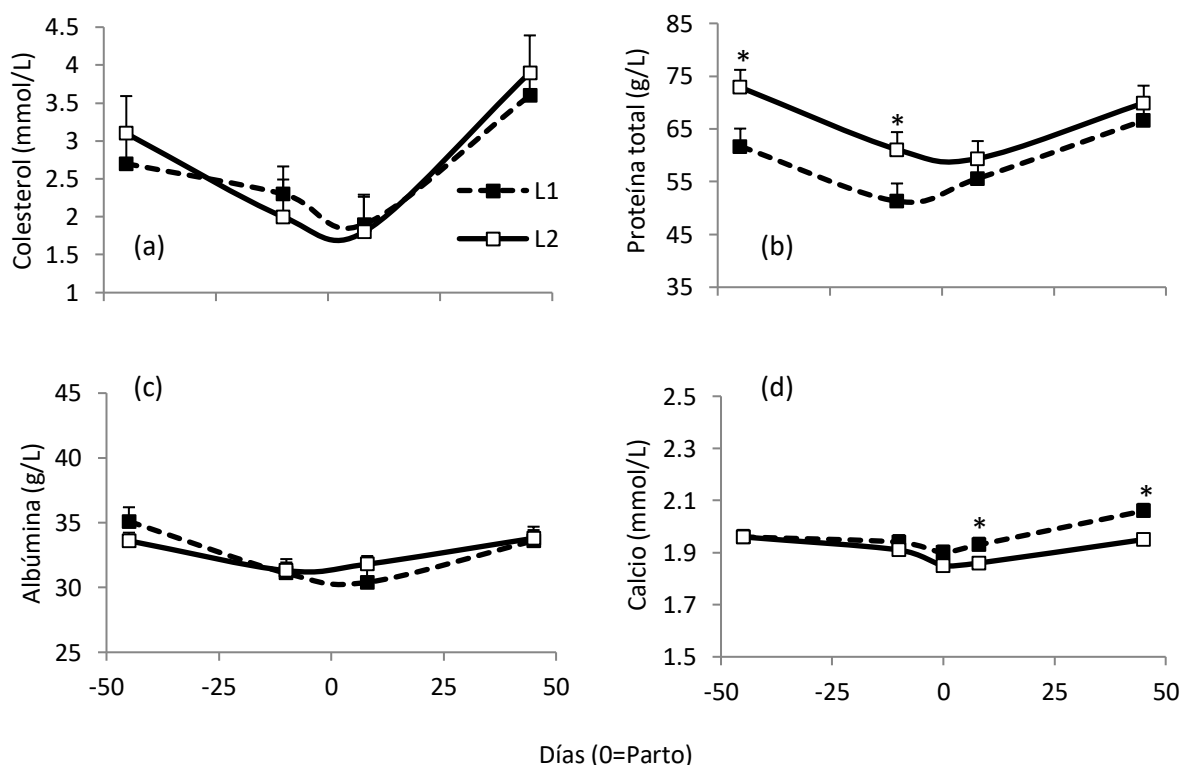
**Tabla 1.** Pruebas F de efectos fijos incluidos en el modelo para parámetros en vacas primíparas y múltíparas en condiciones de pastoreo. Los efectos fijos fueron paridad, período y la interacción entre ambos.

Variable (unidad)	Paridad	Período	Paridad x Período
CC	***	***	0,07
Producción (kg)	***	***	0,54
NEFA (mmol/L)	**	***	0,44
BHB (mmol/L)	0,43	***	0,54
Colesterol (mmol/L)	0,81	***	***
Proteína total (g/L)	***	***	*
Albúmina (g/L)	0,63	***	0,19
Calcio (mmol/L)	0,08	***	0,51
Insulina (ng/mL)	0,95	***	0,82
IGF-I (ng/mL)	0,32	***	***
Leptina (ng/mL)	0,84	0,08	0,09
Adiponectina (ng/mL)	0,52	0,09	0,51
WBC (cel/mL)	0,91	***	0,75
Neutrófilos (cel/mL)	0,73	**	0,47
Linfocitos (cel/mL)	0,64	**	0,61
Monocitos (cel/mL)	0,89	**	0,54

\*  $P < 0,05$  \*\*  $P < 0,01$  \*\*\*  $P < 0,001$

### 7.1.3 Concentración de colesterol, proteína total, albúmina y calcio

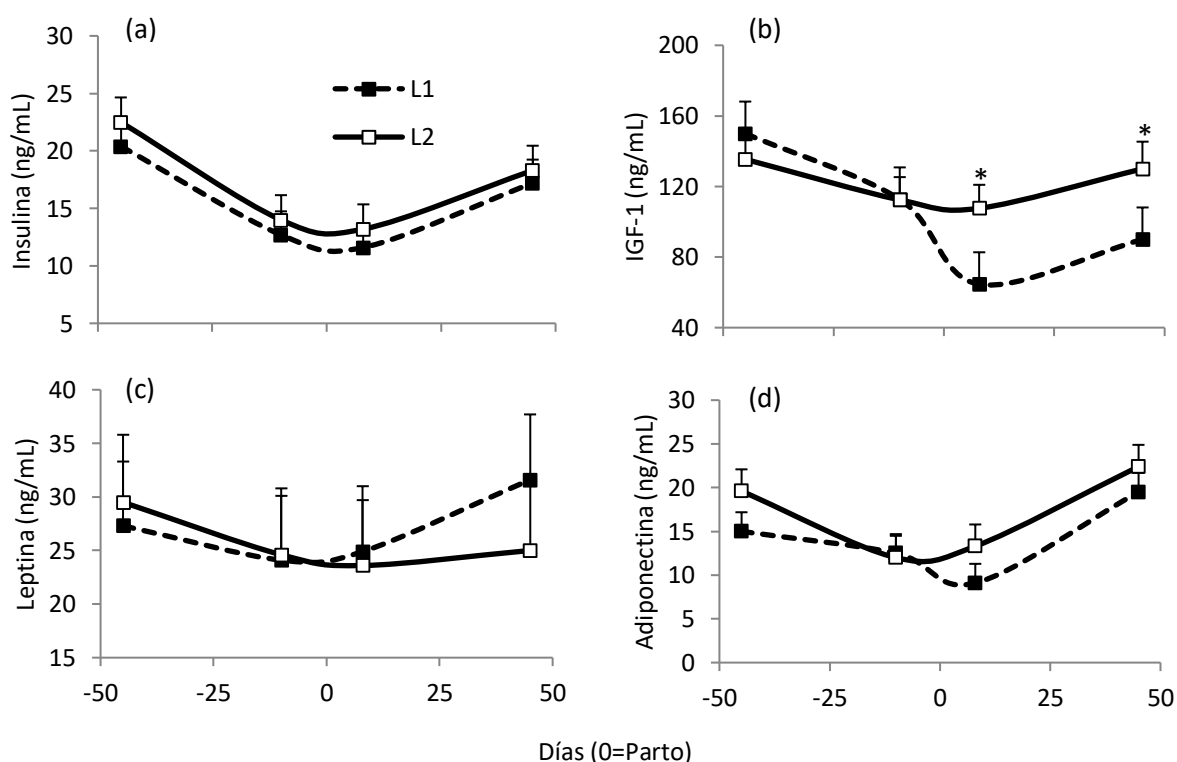
Se halló efecto del período e interacción significativa con la categoría animal para las concentraciones séricas de colesterol (Tabla 1). Las mismas comenzaron su descenso previo al parto, alcanzando su nadir en el primer muestreo posparto, comenzando luego de ello su ascenso (Figura 3-a). La categoría múltipara, tendió ( $P= 0,07$ ) a presentar mayores concentraciones de colesterol a los 45 días anteriores y posteriores al parto (Figura 3-a). Los niveles séricos de proteína total se muestran en la Figura 3-b. El descenso en los mismos, fue afectado por la paridad, el período, con una interacción entre ambos efectos (Tabla 1). Las concentraciones de proteína total disminuyeron gradualmente durante las mediciones preparto, momento en el cual la categoría múltipara presentó concentraciones superiores con respecto a la categoría primípara (Figura 3-b). Ambos grupos mostraron incrementos en las concentraciones de proteína total durante el posparto (Figura 3-b). Las concentraciones de albúmina fueron afectadas por el período (Tabla 1). Las mismas se pueden observar en la Figura 3-c, visualizándose un descenso en el preparto y un posterior ascenso durante las mediciones posparto. Las concentraciones de calcio durante el período en estudio, fueron afectadas por el período (Tabla 1), detectándose un descenso al momento del parto. Las vacas primíparas presentaron mayores niveles de calcio que sus homólogas múltiparas durante el posparto (Figura 3-d).



**Figura 3.** Perfiles en las concentraciones séricas (media  $\pm$  error) de (a) colesterol (mmol/L), (b) proteína total (g/L), (c) albúmina (g/L) y (d) calcio (mmol/L), en vacas primíparas (L1) y vacas múltiparas (L2). Los asteriscos (\*) indican diferencias en  $P \leq 0,05$ .

### 7.1.4 Concentraciones hormonales

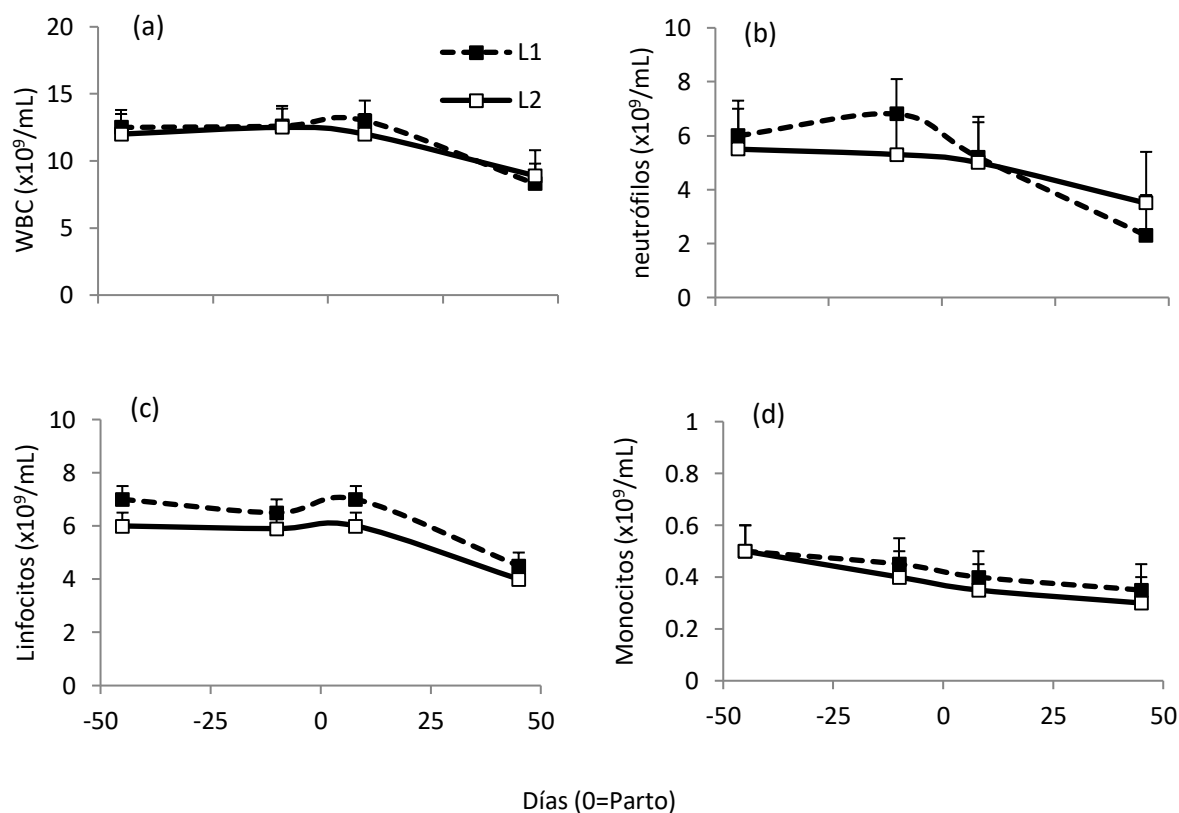
Las concentraciones de insulina fueron afectadas por los días relativos al parto (Tabla 1); los niveles comenzaron a disminuir durante el preparto, alcanzando concentraciones mínimas durante el parto, concentraciones que comenzaron a ascender luego de ello (Figura 3-a). Se halló efecto de período sobre las concentraciones de IGF-I (Tabla 1). Las concentraciones de IGF-I comenzaron a disminuir 45 días antes del parto, tanto en vacas multíparas como en primíparas, alcanzando valores basales en torno al parto (Figura 3-b). Las curvas de concentración de IGF-I difirieron según la categoría animal; las vacas primíparas presentaron descensos significativamente más pronunciados que las vacas multíparas durante las observaciones posparto (Figura 3-b). Los niveles séricos de leptina no fueron afectados por la categoría animal, hallándose una tendencia sobre los días relativos al parto (Tabla 1). Las concentraciones de leptina, en ambas categorías, tendieron a presentar un descenso en el preparto, con una subsecuente recuperación en el posparto (Figura 3-c). Los niveles séricos de adiponectina se pueden observar en la Figura 3-d, los cuales tendieron a descender en torno al parto. No se halló efecto de paridad en dicha variable (Tabla 1).



**Figura 4.** Perfiles en las concentraciones séricas (media  $\pm$  error) de (a) insulina (ng/mL), (b) IGF-I (ng/mL), (c) leptina (ng/mL) y (d) adiponectina (ng/mL), en vacas primíparas (L1) y vacas multíparas (L2). Los asteriscos (\*) indican diferencias en  $P \leq 0,05$ .

### 7.1.5 *Conteo total y diferencial de leucocitos*

Los resultados relativos al conteo total y diferencial de leucocitos, se resumen gráficamente en la Figura 5. Se halló efecto del período para el conteo total de glóbulos blancos (Tabla 1). El recuento total de glóbulos blancos comenzó a descender, en ambas categorías, a partir del día 8 posparto, descenso que se mantuvo hasta el día 45 posparto (Figura 5-a). Analizando en detalle las poblaciones de leucocitos, el recuento de neutrófilos reflejó un patrón similar al del recuento total de leucocitos (Figura 5-b), con un marcado descenso a partir del día 10 previo al parto. La población de linfocitos mostró una tendencia similar a la observada para los neutrófilos (Figura 5-c). El recuento de linfocitos comenzó su descenso a partir del día 8 posparto, descenso que se mantuvo durante el período mencionado. En la Figura 5-d, se puede visualizar el descenso en los recuentos de monocitos, descenso que se inicia sobre los 10 días previos al parto, pronunciándose en las observaciones posparto. La categoría animal no afectó el conteo total de glóbulos blancos, neutrófilos, linfocitos y monocitos (Tabla 1).



**Figura 5.** Conteo (media  $\pm$  error) de (a) células blancas (WBC;  $\times 10^9/\text{mL}$ ), (b) neutrófilos ( $\times 10^9/\text{mL}$ ), (c) linfocitos ( $\times 10^9/\text{mL}$ ) y (d) monocitos ( $\times 10^9/\text{mL}$ ), en vacas primíparas (L1) y vacas múltíparas (L2).

## 7.2 *Experimento II*

### 7.2.1 *Concentración de metabolitos*

Al estudiar el efecto del período de lactancia (lactancia temprana vs lactancia media) sobre las concentraciones séricas de metabolitos, se encontró efecto sobre las concentraciones de NEFA, siendo mayores en el grupo de lactancia temprana con respecto al grupo de lactancia media (Tabla 2). Por el contrario, los niveles séricos de BHB no fueron significativamente diferentes entre los grupos (Tabla 2). Por otro lado, las concentraciones séricas de colesterol, proteína total y calcio fueron mayores en el grupo de lactancia media en relación al grupo de lactancia temprana (Tabla 2). Asimismo, las concentraciones séricas de albúmina tendieron ( $P=0,08$ ) a ser superiores en el grupo de lactancia media.

**Tabla 2.** Efecto del período de lactancia (lactancia temprana vs lactancia media) sobre las concentraciones séricas (media  $\pm$  error) de NEFA, BHB, colesterol, proteína total, albúmina y calcio.

Variable (unidad)	Grupo lactancia temprana	Grupo lactancia media	P valor
NEFA (mmol/L)	$0,35 \pm 0,05^a$	$0,11 \pm 0,05^b$	0,007
BHB (mmol/L)	$1,05 \pm 0,14$	$1,06 \pm 0,14$	ns
Colesterol (mmol/L)	$2,93 \pm 0,2^a$	$5,63 \pm 0,2^b$	<0,001
Proteína total (g/L)	$68,1 \pm 1,67^a$	$78,1 \pm 1,67^b$	0,0006
Albúmina (g/L)	$32,55 \pm 1,02$	$35,1 \pm 1,02$	0,08
Calcio (mmol/L)	$2,08 \pm 0,04^a$	$2,21 \pm 0,04^b$	0,05

NEFA = non-esterified fatty acids; BHB =  $\beta$ -hydroxybutyrate.

Grupo lactancia temprana =  $14 \pm 4$  días posparto.

Grupo lactancia media =  $123 \pm 31$  días posparto.

Para cada variable sanguínea, las diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre los grupos de lactancia se determinaron mediante pruebas de Tukey-Kramer indicadas con diferentes letras (a, b).

### 7.2.2 *Concentraciones hormonales*

Al estudiar el efecto del período de lactancia (lactancia temprana vs lactancia media) sobre las concentraciones hormonales, se encontró efecto sobre las concentraciones de insulina e IGF-I, siendo mayores para el grupo de lactancia media en relación al grupo de lactancia temprana (Tabla 3). Asimismo, los niveles séricos de leptina tendieron ( $P=0,06$ ) a ser superiores en el grupo de lactancia media (Tabla 3). Las concentraciones séricas de adiponectina no fueron diferentes entre los grupos de lactancia (Tabla 3).

**Tabla 3.** Efecto del período de lactancia (lactancia temprana vs lactancia media) sobre las concentraciones séricas (media  $\pm$  error) de insulina, IGF-I, leptina y adiponectina.

Variable (unidad)	Grupo lactancia temprana	Grupo lactancia media	P valor
Insulina (ng/mL)	14,9 $\pm$ 2,8 <sup>b</sup>	30,7 $\pm$ 2,8 <sup>a</sup>	0,003
IGF-I (ng/mL)	70,8 $\pm$ 12,2 <sup>b</sup>	98,1 $\pm$ 11,5 <sup>a</sup>	0,05
Leptina (ng/mL)	19,9 $\pm$ 2,8	27,9 $\pm$ 2,8	0,06
Adiponectina (ng/mL)	77,3 $\pm$ 6,8	79,5 $\pm$ 6,8	ns

IGF-I = insulin-like growth factor I.

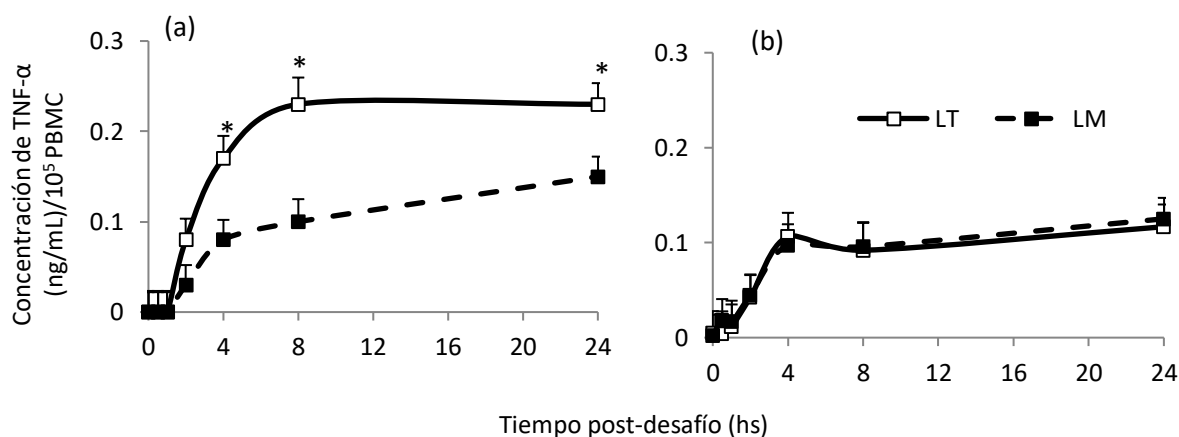
Grupo lactancia temprana = 14  $\pm$  4 días posparto.

Grupo lactancia media = 123  $\pm$  31 días posparto.

Para cada variable sanguínea, las diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre los grupos de lactancia se determinaron mediante pruebas de Tukey-Kramer indicadas con diferentes letras (a,b).

### 7.2.3 Curvas de producción de TNF- $\alpha$ luego del desafío *in vitro* con *E. coli*

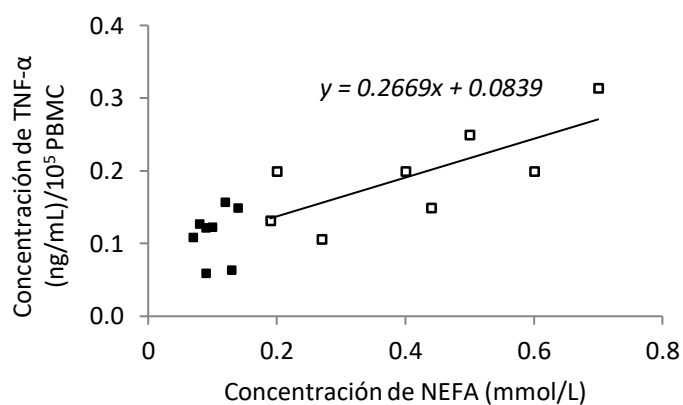
La estimulación de las células mononucleares resultó en un incremento en los niveles de TNF- $\alpha$  en comparación con los controles negativos (datos no mostrados). El análisis de pruebas F de efectos fijos arrojó que tanto el grupo de lactancia ( $P= 0,02$ ), suero ( $P= 0,006$ ), tiempo post-desafío ( $P < .000$ ), y la interacción entre los mencionados ( $P= 0,03$ ), fueron factores que influyeron en la producción de la mencionada citoquina. La curva de producción de TNF- $\alpha$  con respecto a la etapa de lactancia (lactancia temprana vs lactancia media), suero (suero autólogo vs suero fetal bovino), tiempo de estimulación (0, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 24 hs) y sus interacciones son resumidas en la Figura 6.



**Figura 6.** Concentración de TNF- $\alpha$  (ng/mL)/10<sup>5</sup> PBMC luego de la estimulación (hs) con *E. coli* ECC-Z irradiada con UV en cultivos de PBMC en suero autólogo (a) y suero fetal bovino (b) según lo determinado por el kit de ELISA. Las líneas negras continuas representan el grupo de lactancia temprana (14  $\pm$  4 DPP) y las líneas punteadas el grupo de lactancia media (123  $\pm$  31 DPP). Todos los puntos representan la media (n= 8) con barras de error que simbolizan el error estándar. Las diferencias significativas se determinaron mediante medidas repetidas con las pruebas de Tukey-Kramer indicadas con un asterisco (\*)  $P \leq 0,05$ .



Independientemente del grupo de lactancia (lactancia temprana vs lactancia media), las concentraciones de TNF- $\alpha$  se incrementaron hacia 1 h post-desafío *in vitro* con *E. coli*, luego de una fase de latencia (Figura 6-a). A partir de 4 hs post-desafío, las células mononucleares obtenidas del grupo de lactancia temprana tuvieron una producción más exacerbada ( $P < 0,01$ ) de TNF- $\alpha$  en comparación con el grupo de lactancia media, cuando las células se co-cultivaron con suero autólogo (Figura 6-a). La mencionada producción de TNF- $\alpha$  en el grupo de lactancia temprana tuvo su límite máximo a las 8 hs post-desafío, momento en que las diferencias entre ambos grupos fueron mayores ( $P= 0,0002$ ; Figura 6-a). En este momento se realizó un análisis univariado entre la concentración de TNF- $\alpha$  y las concentraciones séricas de metabolitos y hormonas de los animales en estudio. El mismo mostró una correlación positiva entre la concentración de TNF- $\alpha$  y la respectiva concentración sérica de NEFA para el grupo de lactancia temprana (correlación de Pearson;  $R= 0,74$ ,  $n= 8$ ,  $P= 0,03$ ; Figura 7).



**Figura 7.** Correlación entre la concentración de TNF- $\alpha$  (ng/mL)/10<sup>5</sup> PBMC a las 8 hs post-desafío *in vitro* con *E. coli* y los niveles séricos de NEFA (mmol/L), de vacas en lactancia temprana (□) y vacas en lactancia media (■), bajo un sistema mixto de alimentación. La línea sólida representa la correlación lineal de Pearson.

En el presente estudio no se observó efecto del grupo de lactancia en términos de producción de TNF- $\alpha$  cuando las células mononucleares se co-cultivaron en suero fetal bovino (Figura 6-b). Asimismo, esta respuesta no fue diferente cuando se asoció con la curva de producción de TNF- $\alpha$  del grupo de lactancia media co-cultivada en suero autólogo (Figura 6 a-b). En cambio, la producción de TNF- $\alpha$  del grupo de lactancia temprana co-cultivada en suero autólogo, fue mayor a partir de las 8 hs post-desafío cuando se interaccionó con las curvas obtenidas en co-cultivos con suero fetal bovino (Figura 6 a-b).

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 *Experimento I*

El presente experimento, fue diseñado para estudiar la asociación entre el metabolismo y el recuento de células de la inmunidad innata y adaptativa, durante el período transicional. Con este objetivo, y especialmente para evaluar el efecto de la categoría animal y la relación temporal sobre los parámetros mencionados, se realizaron muestreos secuenciales antes y luego del parto. Según nuestro conocimiento, este es el primer estudio en nuestro país, que caracteriza los perfiles endócrinos metabólicos y el recuento de células del sistema inmune en vacas primíparas y multíparas en sistemas pastoriles de producción de leche.

Las concentraciones de NEFA y BHB, son las variables metabólicas utilizadas con mayor frecuencia en el monitoreo del estado energético en las vacas lecheras (Ospina et al., 2013; Overton et al., 2017). Los aumentos de NEFA y BHB encontrados alrededor del parto son consistentes con otros reportes. Han van der Kolk et al. (2017) han señalado, que los acrecentamientos en las concentraciones séricas de estas variables son indicadores de un desbalance energético, el cual es característico del período en torno al parto. Centrándonos en lo que refiere al desbalance energético y las adaptaciones endócrino-metabólicas durante dicho período, estudios han señalado un efecto de paridad en las concentraciones de NEFA a nivel sérico (Meikle et al., 2004; Wathes et al., 2007; Rupprechter et al., 2018). Estos estudios, encontraron diferentes concentraciones séricas de NEFA durante el período en torno al parto, tanto en vacas primíparas y multíparas, sin embargo, los resultados de estos experimentos fueron contrastantes, divergencias propias de las cualidades de los sistemas productivos. En nuestro experimento, las vacas primíparas presentaron concentraciones séricas de NEFA superiores durante todo el período en estudio (Figura 2-a), respecto a sus homólogas multíparas. Como se ha señalado con anterioridad, esta implicancia biológica podría explicarse por mayores requerimientos energéticos por parte de las primíparas, las cuales prosiguen su crecimiento sincrónicamente con las demandas para la lactogénesis (Rémond et al., 1991). Grant y Albright (2001) han subrayado que las mayores demandas energéticas en las vacas primíparas pueden deberse a las menores tasas de consumo y el estrés asociado a la primera lactancia. Es menester denotar, que el notorio desbalance energético sobre la categoría primípara, posiblemente por mayores requerimiento y menores tasas de consumo, reflejan las curvas de producción de leche (Figura 1-b). Las mayores concentraciones de NEFA en vacas primíparas, reflejan mayores tasas lipolíticas y por consecuente descensos más pronunciados en las reservas corporales, descensos visualizados en dicha categoría en nuestro experimento (Figura 1-a). Por otro lado, las vacas primíparas presentaron durante el parto, puntuaciones de CC  $\geq 3,5$ , lo que Roche a definido como «sobre-condicionadas» (Roche et al., 2009). En estos animales, el descenso en el consumo de alimento que es característico durante el periparto, se exagera y da como resultado un desbalance energético más profundo, y por tanto, incrementos en las tasas lipolíticas y subsecuente incremento en las concentraciones de NEFA (Roche et al., 2015). De este modo, se ha demostrado que el estado de reservas corporales en el parto y el grado de movilización de las mismas, está estrechamente vinculado con las concentraciones de NEFA y BHB durante el período en torno al parto (Weber et al., 2013; de Koster et al., 2015). En este sentido, Gärtner et al. (2019), detectaron una asociación positiva de pérdida de reservas corporales y concentraciones séricas de NEFA, tanto en vacas multíparas y primíparas durante el parto y el posparto temprano. El aumento en las concentraciones séricas

de NEFA encontradas en ambas categorías, fue seguido por el aumento de las concentraciones de BHB, reflejando el desbalance energético y la escasez de precursores neoglucogénicos (Ingvarsen y Andersen, 2000; Meikle et al., 2013a). Por otro lado, y a diferencia de las concentraciones de NEFA, no se halló efecto de la categoría animal sobre las concentraciones ascendentes de BHB durante el período en estudio (Figura 2-b). Este hallazgo se alinea con lo reportado por Meikle et al. (2004), los cuales informaron efectos no significativos de la categoría animal sobre las concentraciones de BHB. Sin embargo, Wathes et al. (2007) y Gärtner et al. (2019), indicaron mayores ascensos en las concentraciones de BHB en las vacas multíparas, no solo en el parto sino también en el posparto. De igual modo, estos autores determinaron concentraciones séricas de NEFA superiores en la categoría multípara en el posparto temprano. Las diferencias propias de manejo entre sistemas de confinamiento (Wathes et al., 2007) y nuestros sistemas de alimentación mixta (pasturas con suplementación), podrían explicar las divergencias mencionadas.

Independientemente de la categoría animal, las concentraciones de colesterol comenzaron a descender durante el parto, alcanzando niveles basales al parto, e iniciando su recuperación durante el posparto (Figura 3-a), en similitud con reportes anteriores (Cavestany et al., 2005; Bionaz et al., 2007; Adrien et al., 2012; Rupprechter et al., 2018). Los descensos fisiológicos en las tasas de ingesta durante el parto (Bell, 1995a; Chilliard, 1999), se ha asociado a una baja colesterolemia al parto, siendo la mencionada, un buen indicador sobre el balance energético y la respuesta adaptativa al mismo (Herdt, 2000). En este sentido, Gross et al. (2015) manifestaron, que el metabolismo del colesterol se ve afectado por la deficiencia de nutrientes y energía a inicios de lactancia. Como se ha mencionado, los niveles séricos de colesterol iniciaron su recuperación luego del parto, en ambas categorías, sin embargo, las vacas multíparas tendieron a presentar mayor colesterolemia que sus homólogas primíparas a los 45 días posparto, en concordancia por lo denotado por Cavestany et al. (2005). Esta implicancia biológica, podría dar indicios de una recuperación en la tasa de consumo más beneficiosa en las vacas multíparas, en contraposición a las vacas primíparas.

Las concentraciones de proteína total presentaron un descenso durante las observaciones parto, momento en el cual la categoría primípara exhibió menores niveles que las vacas multíparas, diferencias no visualizadas durante el posparto (Figura 3-b). Cavestany et al. (2005), revelando resultados semejantes, manifestaron que el mencionado hallazgo, refleja un desbalance de proteínas más notorio en la categoría primípara en el transcurso del parto. Es propio señalar, que las vacas multíparas presentaron su nivel más bajo de proteína total en el primer muestreo posparto. Del mismo modo, el descenso en las concentraciones de globulinas (proteína total - albúmina, datos no mostrados), reflejan el patrón visualizado para proteína total. Sin embargo, en la categoría primípara, el ascenso en las concentraciones de proteína total y globulina, comenzaron a los 10 días previos al parto. Esta denotación podría estar explicada por las mayores producciones de leche en la categoría multípara, y el aporte de proteínas hacia la lactogénesis (Reist et al., 2003). Independientemente de la categoría animal, las concentraciones de albúmina presentaron un descenso en las mediciones parto (Figura 3-c). Bionaz et al. (2007) expresaron, que los descensos en la albuminemia entorno al parto, podrían indicar una función hepática alterada en dicho período, considerando a la albúmina una nAPP sintetizada por el hígado. Es interesante señalar, que las concentraciones de albúmina en la categoría multípara comenzaron a incrementar a los 10 días previos al parto. Este hallazgo, podría estar suscitado por el

mantenimiento de la presión oncótica capilar por parte de la albúmina, al mismo tiempo en el que las concentraciones de proteína total prosiguen su descenso (Reist et al., 2003).

Como se ha definido con anterioridad, la transición entre la gestación tardía y la lactancia temprana es un período de riesgo significativo para los trastornos metabólicos en la vaca lechera. En este sentido, el riesgo de fiebre de la leche o hipocalcemia, definida como los descensos en las concentraciones séricas de calcio, es consistentemente mayor en este período, especialmente alrededor del parto (Roche y Berry, 2006). En este sentido, en nuestro experimento, las concentraciones de calcio descendieron en torno al parto (Figura 3-d), en similitud por lo reportado por Goff y Horst (1997), los cuales reportaron concentraciones subnormales al parto. Es interesante subrayar, que el 82% de los animales presentaron calcemias al parto en  $\leq 2,1$  mmol/L, concentraciones de calcio sérico generalmente clasificado como hipocalcemia subclínica (Chapinal et al., 2012). El uso de dietas aniónicas durante el parto ha sido ampliamente difundido debido al efecto que estas tienen en la prevención de la fiebre de leche. Esta acción se debe al carácter acidogénico de estas sustancias, capaces de provocar una acidificación digestiva y metabólica, creando así unas condiciones óptimas en el organismo para la circulación del calcio (Block, 1984). En este sentido, el uso de estas sales en el rodeo en estudio, y a la evidencia de los resultados, no estaría satisfaciendo la función mencionada, en tanto, este resultado merece mayor investigación. Este hallazgo, se alinea por lo reportado por Cruz (2019), los cuales revelaron una incidencia de hipocalcemia subclínica de 79%, en sistemas de producción similar al del presente estudio. Por otro lado, las menores concentraciones de calcio observadas en las vacas multíparas durante el posparto (Figura 3-d), ha sido bien establecida (Horst et al., 1997). En este sentido, Houe et al. (2001) y Roche y Berry (2006) denotaron, que el descenso más pronunciado en la categoría multípara, sea el resultado de un mayor nivel de producción de leche, así como también de una capacidad reducida en la movilización de calcio ósea, y una disminución en el transporte intestinal del mismo. En este sentido Reinhardt et al. (2011) ha expuesto que es de esperar una disponibilidad de calcio más favorable en las vacas primíparas que en la categoría multípara, implicancias que dan sustento a nuestros hallazgos.

Durante el período de transición, se presentan cambios sustanciales en las concentraciones de hormonas circulantes, cambios que responden a numerosas adaptaciones homeoréticas a favor de la lactogénesis. En referencia a lo mencionado, se hallaron concentraciones reducidas de insulina alrededor del parto (Figura 4-a), en concordancia con reportes anteriores (Holtenius et al., 2003; Meikle et al., 2004; Pires et al., 2013; Gärtner et al., 2019). Los descensos en torno al parto reflejan las deficiencias energéticas en dicho período (Bertics et al., 1992), descensos que proporcionan un ambiente endócrino favorable hacia el catabolismo periférico (Reist et al., 2003). Weber et al. (2016) han señalado, que los descensos de insulina durante el período mencionado, es parte de una adaptación fisiológica normal, llevando a concentraciones basales más bajas durante el posparto (Mann et al., 2016). En nuestro estudio, no se halló efecto de paridad sobre las concentraciones de insulina. Sin embargo, Meikle et al. (2004) en sistema de producción pastoril, reportaron una tendencia sobre la interacción días relativos al parto y paridad, con mayores niveles de insulina para la categoría multípara. Los mayores niveles de insulina en vacas multíparas podrían indicar un mejor equilibrio de energía en esta categoría, asociado a un control sobre la tasa lipolítica con una pérdida de reservas corporales menos dramática que sus homólogas

primíparas y concentraciones más bajas de NEFA durante el parto. Por el contrario, Wathes et al. (2007) han señalado mayores concentraciones séricas de insulina en la categoría primípara durante todo el período transicional, sin embargo, no obtuvieron efecto de paridad con significancia estadística.

Las concentraciones de IGF-I presentaron un descenso tanto en vacas primíparas y multíparas en momentos en torno al parto (Figura 4-b). El desacople del eje somatotrófico, con una baja expresión de receptores de GH (GH-R) a nivel hepático, se ha asociado con una reducción en la circulación de IGF-I (Lucy et al., 2001). En el mismo sentido, Astessiano et al. (2012) demostraron una menor expresión de transcritos de GH-R e IGF-I durante el posparto temprano en vacas lecheras en sistema pastoril, lo que Wathes et al. (2007) han mencionado como producto del déficit energético e hipoinsulinemia concurrente. Al igual que las concentraciones de insulina, los descensos en las concentraciones séricas de IGF-I en torno al parto, es consistente con el desbalance energético que caracteriza este período (Reist et al., 2003). Como hemos señalado, los descensos de IGF-I e insulina reordenan el metabolismo hacia una dirección catabólica, favoreciendo el flujo de nutrientes hacia la glándula mamaria y proporcionando sustratos para la síntesis de leche (Chilliard, 1999; Holtenius et al., 2003). En el presente experimento, la categoría multípara presentó concentraciones más altas durante el posparto que las vacas primíparas, como ha sido reportado previamente en trabajos en sistemas de producción similares al presente (Meikle et al., 2004). Sin embargo, la producción de leche fue notoriamente mayor para las multíparas. Estos resultados un tanto contradictorios, podrían sugerir que la categoría multípara presenta una mejor adaptación a la lactancia, con un mejor reparto de nutrientes entre los tejidos corporales y la síntesis de leche. Por otro lado, este resultado se encuentra en contraste con Wathes et al. (2007) quienes informaron, en sistema de estabulación, mayores concentraciones de IGF-I en la categoría primípara asociado al crecimiento. Estos datos pueden sugerir que el manejo animal y/o las diferencias genéticas entre sistemas, pueden tener efectos sobre la madurez relativa al primer parto y su posterior adaptación a la lactancia.

Las concentraciones de leptina comenzaron su descenso en el preparto (Figura 4-c), en concordancia con estudios anteriores (Kadokawa et al. 2000; Block et al. 2001; Meikle et al., 2004). La leptina, hormona de interés en lo que refiere al equilibrio energético, está positivamente ligada con los depósitos de grasa (Delavaud et al., 2000), variando en tanto según el estado de reservas corporales (Ehrhardt et al., 2000). Meikle et al. (2004) han señalado, que el contenido de leptina en plasma es un buen indicador de reservas corporales en el preparto. Es importante destacar, que las concentraciones más bajas de leptina en momentos en torno al parto coinciden con las concentraciones séricas más altas de NEFA, en otras palabras, las concentraciones de leptina se pueden asociar negativamente con la movilización de reservas corporales y consecuente pérdida de las mismas (Reist et al., 2003). Sin embargo, en nuestro estudio, no hallamos diferencias entre grupos de paridad para concentraciones de leptina, pese a encontrar diferencias en CC. Ingvarsen y Boisclair (2001) han señalado, que la disminución en las concentraciones de leptina podría catalogarse como estratégica, cesando el efecto inhibitorio sobre el apetito y estimulando el consumo en etapas críticas en materia de desbalance energético. Es interesante subrayar, que los niveles de leptina comenzaron a ascender durante la primera semana posparto, de acuerdo con lo reportado por Kadokawa et al. (2000) y Reist et al. (2003), pese a los descensos mantenidos en las reservas corporales durante dicho período. Esta implicancia biológica, podría estar

explicada por ausencia o carencia de relación entre las concentraciones de leptina y reservas corporales luego del parto (Holtenius et al., 2003). Por otro lado, los ascensos en las concentraciones séricas de leptina, podrían asociarse con el incremento en las concentraciones de insulina visualizadas en ambos grupos. En este sentido, Houseknecht et al. (2000) han señalado incrementos en la expresión de leptina debido a ascensos en las concentraciones circulantes de insulina, denotando que tanto la leptina, insulina e IGF-I son importantes en la homeostasis endócrino-metabólica durante el período de transición en la vaca lechera. Como se ha mencionado, el presente estudio no pudo demostrar efecto de la categoría animal sobre las concentraciones de leptina. Meikle et al. (2004) reportaron mayores concentraciones de leptina en vacas multíparas y un descenso menos abrupto durante el periparto lo que es consistente con una mejor adaptación metabólica al periparto de esta categoría respecto de la primípara. Por otro lado, y en el mismo contexto, la categoría animal no afectó los niveles plasmáticos de adiponectina. Nuestro estudio ha demostrado una tendencia en el descenso en las concentraciones séricas de adiponectina en el periparto (Figura 4-d), en concordancia con otros estudios (Mielenz et al., 2013; Singh et al., 2014). En este sentido, Singh et al. (2014) han revelado una fase de descenso durante las últimas semanas de gestación, seguida de una fase ascendente luego del parto. Krumm et al. (2017) han subrayado, que los descensos en los niveles de adiponectina en torno al parto, puede deberse a la ausencia de cambios transcripcionales reguladores de la génesis de adiponectina en el tejido adiposo. La adiponectina es una hormona sensibilizante a la insulina, en tanto, su reducción podría contribuir a la resistencia periférica a la insulina, en vacas lecheras durante el periparto (Singh et al., 2014). En este sentido, el descenso en los niveles de adiponectina favorecería la síntesis de glucosa por parte del hígado y el aporte consecuente hacia la glándula mamaria, en momentos de máximos requerimientos energéticos (De Koster et al., 2017). En períodos de deficiencia de energía, la disminución en las concentraciones de adiponectina parecería importante para lograr la adaptación a los incrementos en las tasas metabólicas en lactancia temprana. Entre tanto, Krumm et al. (2017) denotaron, que los mecanismos que regulan la adiponectina plasmática en vacas lecheras durante el periparto, no se conocen completamente y merecen mayor investigación.

En nuestro estudio, independientemente de la categoría animal, los recuentos de leucocitos totales a nivel circulatorio se mantuvieron en niveles constantes hasta el día 8 posparto (Figura 5-a), localizándose dentro del rango reportado por estudios anteriores (George et al., 2010; McDougall et al., 2017; Hassfurth et al., 2015). Es interesante denotar, que la concentración de neutrófilos en la categoría primípara tendió a incrementar hasta el día 10 previo al parto (Figura 5-b), ascenso no tan pronunciado en la categoría multípara (Figura 5-b). Beagley et al. (2010) han observado incrementos, tanto en vacas primíparas como multíparas, de neutrófilos en momentos cercanos al parto, hallazgo que podría estar justificado por una respuesta normal a los estímulos inflamatorios y estresantes, necesarios para el curso correcto del parto. En este sentido, los mencionados, han indicado que el incremento adecuado de neutrófilos y monocitos, y su correcta migración hacia la placenta, es necesaria para proceder a un proceso inflamatorio correcto y disolver posteriormente el enlace colágeno fetal-materno, en momentos culmines de la gestación. En la misma línea, Weber et al. (2004) denotaron, que durante el período cercano al parto, las concentraciones elevadas de glucocorticoides a nivel plasmático, producto de los fenómenos asociados al desencadenamiento del parto (Burton et al., 1995), reducen la expresión de moléculas de adhesión (L-selectina) en la superficie de neutrófilos. Esto último, provoca un

descenso en la migración desde el endotelio a los sitios de infección (Monfardini et al., 2002), provocando un relativo ascenso en el tráfico de estas células a nivel circulatorio, al mismo tiempo que la funcionalidad está en detrimento (Sordillo y Streicher, 2002; Crookenden et al., 2019).

Analizando en detalle las subpoblaciones de leucocitos, hallamos patrones similares para el recuento de neutrófilos, linfocitos y monocito, presentando descensos paulatinos en el posparto. Estos patrones de descenso se alinean con lo reportado por Kehrlí y Goff (1989b) y Kimura et al. (2014), indicando especialmente neutropenia luego del parto. Un estudio reciente, ha informado el efecto del estrés metabólico durante el período de transición, sobre la expresión génica asociada a la funcionalidad reducida a nivel leucocitario (Crookenden et al., 2019). A nivel de las células de la inmunidad innata y adaptativa, la función que más se ve afectada, es en referencia a la capacidad fagocítica y estallido oxidativo. En este sentido, Hammon et al. (2006) revelaron que las concentraciones de NEFA, elevadas en torno al parto, se asociaron con funciones de neutrófilos disminuidas, como el descenso en la capacidad fagocítica y de estallido oxidativo (Suriyasathaporn et al., 2000; Scalia et al., 2006), dando como resultado un estado de inmunosupresión. En este sentido, los ascensos en las concentraciones de NEFA, producto de su efecto a nivel del sistema inmune, se han relacionado como factor de riesgo de mastitis y enfermedades uterinas (Burton y Erskine, 2003; Moyes et al., 2009; Ospina et al., 2010a; McArt et al., 2013), coincidiendo con el período más crítico desde el punto de vista endócrino-metabólico en la vaca lechera. Sin embargo, esto puede deberse en parte a un sesgo en la investigación, debido a que son las cualidades más estudiadas a nivel de la funcionalidad leucocitaria (LeBlanc, 2020). Hay menos reportes en cuanto a la capacidad migratoria, apoptosis, y sobre el efecto en la génesis, proliferación y concentración circulante de estas células y menos aún el efecto de la categoría animal sobre dichas variables. En este sentido, LeBlanc (2020) manifestó, que sería de gran importancia investigar y comprender, si los cambios endócrino-metabólicos impactan durante el proceso de leucopoyesis en la vaca lechera durante el período de transición. Minuti et al. (2020) han formulado y expuesto, que los mecanismos involucrados en el deterioro de la función y las concentraciones leucocitarias durante el posparto temprano, en la vaca lechera, no se comprende completamente.

Invgartsen y Moyes (2015) han denotado, que la deficiencia energética con descensos en las concentraciones de glucosa, provocan una desregulación en lo que refiere a la proliferación, supervivencia y diferenciación de las células del sistema inmune. Tornquist y Rigas (2010) han subrayado, que la leucopenia, definida como el descenso en los recuentos de leucocitos, inmediatamente luego del parto y descenso mantenido durante el posparto temprano, generalmente se asocia con una respuesta al estrés metabólico característico en dicho período. Por otro lado, McDougall et al. (2017) han indicado, que los descensos en el tráfico de leucocitos durante los primeros días luego del parto pueden deberse a la migración de estos a los sitios de infección, principalmente la glándula mamaria y útero. Nonnecke et al. (2003) y Ster et al. (2012) expresaron, que la disminución de la capacidad de respuesta de los leucocitos a los agentes mitogénicos a nivel *in vitro*, es un factor importante en la desregulación en las células del sistema inmune durante la transición. En parte, estos diseños *in vitro*, en el cual se estudia la respuesta mitogénica a nivel leucocitario, puede semejarse a la leucopoyesis medular en el animal. En este sentido, Ster et al. (2012) observaron una correlación negativa entre las concentraciones de NEFA y la proliferación de leucocitos,

comprendiendo por proliferación celular, al comportamiento del ciclo de las células en lo que refiere a la fracción de crecimiento y actividad mitogénica. Resultados similares fueron manifestados previamente por Lacetera et al. (2004), mostrando que los ascensos en las concentraciones de NEFA, inhibían la proliferación de leucocitos, específicamente PBMC.

Por otro lado, varias investigaciones han indicado el papel del aumento de BHB como causa de disfunción leucocitaria en la vaca lechera (Sartorelli et al., 2000; Scalia et al., 2006; Kimura et al., 2014; Moretti et al., 2016). En este sentido, Hoeben et al. (2000) revelaron, que el BHB y sus concentraciones séricas, habitualmente incrementadas en torno al parto, inhiben la proliferación de células hematopoyéticas en la medula ósea. En nuestro estudio, todos los animales involucrados, sin excepciones de categoría animal, experimentaron cetosis subclínica durante el posparto (BHB  $\geq$  1,4 mmol/L; Duffield et al., 2009). Es menester señalar, que los animales no presentaron ninguna sintomatología clínica y mantuvieron niveles de producción, tanto en la categoría múltipara como en la primípara, niveles de producción elevados considerando un sistema de producción con una base pastoril. Entretanto, Minuti et al. (2020) informaron, que los acrecentamientos en la prevalencia de cetosis subclínica, inhibió notoriamente las vías de transcripción génica, específicamente los procesos relacionados con el ciclo celular, replicación y reparación del ADN. Esto último, refuerza en cierta medida lo reportado por Targowski y Klucinski (1983) y Franklin et al. (1991), los cuales observaron una disminución en la respuesta mitogénica de leucocitos, debido al incremento de cuerpos cetónicos. Lo mencionado, podría explicar los descensos en las concentraciones en el conteo total de leucocitos, al mismo tiempo que las concentraciones de BHB siguen paulatinamente su ascenso en el posparto. En este sentido, Sato et al. (1995a) revelaron, que un ambiente con ascendentes concentraciones de cuerpos cetónicos, suprimió la blastogénesis de linfocitos bovinos, entendiéndose por blastogénesis o transformación blastogénica, el agrandamiento celular que precede a la división celular. Este descenso en la transformación blastogénica, se ha asociado con incrementos en la incidencia de mastitis y trastornos uterinos (Sato et al., 1995b). Sin embargo, Ster et al. (2012) denotaron, que los ascensos en las concentraciones de BHB, por sí solas, no presentaron efecto sobre la proliferación de PBMC, grupo de células inmunes de importancia sobre las defensas y la inflamación en el posparto temprano. En la misma línea, Meganck et al. (2015) no pudieron demostrar un efecto significativo de BHB sobre la proliferación inducida por mitógenos a nivel *in vitro*. Como se puede observar, las investigaciones a cerca de los efectos del desbalance energético en torno al parto, sobre las concentraciones de células inmunitarias a nivel de la circulación periférica, son inconsistentes.

El presente estudio, no encontró un efecto de la categoría animal sobre el recuento total y diferencial de leucocitos. Consideramos que una de las mayores limitaciones en el presente experimento, es el bajo número de animales, conjuntamente con la variabilidad individual moderadamente alta registrada de las variables leucocitarias, pueden en cierta forma, evitar el haber encontrado diferencias en cuanto a la categoría animal. Sin embargo, la realización de este estudio en un solo establecimiento mejora en cierta manera la validez y los hallazgos biológicos determinados. De este modo, todos los animales seleccionados fueron expuestos de igual manera a factores de rodeo, como el manejo, alimentación, uniformidad genética y estación climática. Sin embargo, Meganck et al. (2015) demostraron que la paridad tiene un efecto significativo sobre la proliferación inducida por mitógenos a nivel *in vitro*. Estos autores, demostraron que las



vacas multíparas presentaban valores de proliferación más bajos que las primíparas. El efecto del envejecimiento sobre la leucopoyesis ha sido descrito en humanos (Meganck et al., 2015), sin embargo, esta hipótesis debe ser demostrada en la vaca lechera.

En resumen, la deficiencia energética característica durante el período periparto en la vaca lechera, se puede observar en los perfiles endócrino-metabólicos encontrados en nuestro estudio. Estas adaptaciones homeoréticas son necesarias para el ascenso en la disponibilidad de sustratos energéticos y a fin de cubrir las exigencias de la lactogénesis. Por otro lado, las observaciones en la adaptación endócrino-metabólica mostraron un perfil más desequilibrado en la categoría primípara, sin embargo, el desbalance energético más pronunciado en esta categoría, no se visualizó en el conteo de leucocitos circulantes. Como se ha expuesto en este apartado, la categoría animal impacta sobre la endocrinología metabólica en la vaca lechera y teniendo en cuenta que esta última afecta el sistema inmune, el efecto de la paridad sobre el conteo de leucocitos merece mayor investigación. En nuestro conocimiento, este fue el primer estudio que caracterizó el perfil endócrino-metabólico y su asociación con el recuento de leucocitos, según la categoría animal, en vacas lecheras en sistema mixto de alimentación durante el período transicional.

## 8.2 Experimento II

Nuestro conjunto de datos describe el efecto de la etapa de lactancia (lactancia temprana vs lactancia media) sobre la funcionalidad de las PBMC en términos de secreción de TNF- $\alpha$ , en vacas Holstein-Friesian, multíparas y de un sistema mixto de alimentación, luego de la estimulación *in vitro* con una cepa de *E. coli* aislada de un caso clínico de mastitis bovina (Dogan et al., 2006; Pomeroy et al., 2015,2016). Esto nos permite abordar nuestros objetivos de asociación entre el período de lactancia (y el ambiente metabólico) y la respuesta pro-inflamatoria. Cabe destacar que para el presente estudio se seleccionaron vacas lecheras no gestantes, con el fin de excluir factores propios de la gestación (Barkema et al., 1998).

Las concentraciones de TNF- $\alpha$  en ambos grupos en estudio, presentaron una fase de latencia durante aproximadamente la primera hora de estimulación, cuando las células fueron desafiadas en co-cultivos con el suero autólogo correspondiente a cada animal (Figura 6-a). Este hallazgo está de acuerdo con lo reportado por Trevisi et al. (2015) en donde indicaron que la producción de citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- $\alpha$ , presentan una fase de latencia inicial. Loo et al. (2007) han subrayado que esta fase estacionaria al comienzo del estímulo puede deberse a la incapacidad del TNF- $\alpha$  a almacenarse como molécula pre-formada y al inicio por lo tanto de una nueva transcripción génica y consecuente secreción de las mencionadas. Las células mononucleares aisladas de vacas lecheras en lactancia temprana y co-cultivadas en suero autólogo, produjeron más TNF- $\alpha$  que el grupo de lactancia media a partir de las horas subsecuentes de la estimulación. Por otro lado, observamos que las células mononucleares de ambos grupos de lactancia co-cultivadas con SFB, respondieron a un incremento en la producción de TNF- $\alpha$ , aumento que no fue diferente entre los grupos. En otras palabras, cuando las PBMC de ambos grupos se co-cultivaron con igual suero, con igual entorno endócrino-metabólico, la respuesta en términos de TNF- $\alpha$  fue igual para ambos grupos. Por lo tanto, nuestro estudio sugiere que las características que presenta el entorno o ambiente en el cual las células son co-cultivadas o desafiadas, juega un papel muy importante en la capacidad funcional de las PBMC en la regulación

productiva de TNF- $\alpha$ . Por otro lado, los ensayos realizados fueron normalizados a un número estándar de células ( $10^5$  células), lo que elimina el posible efecto del número de células en circulación. Por lo tanto, la capacidad funcional de las PBMC, en términos de TNF- $\alpha$ , fue expresado en función de la concentración celular, expresión que fue utilizada por Sander et al. (2011), y hacer posible una mejor comprensión en términos de funcionalidad celular.

En este experimento simulamos de manera *in vitro* una infección con una bacteria gramnegativa, más precisamente *E. coli*, la cual, y como se ha mencionado con anterioridad, es proveniente de un caso clínico de mastitis bovina (Dogan et al., 2006) y utilizada para desafíos *in vitro* (Pomeroy et al., 2015). Si bien este tipo de simulación tiene diferencias sustanciales con lo ocurrido dentro del animal, Sordillo et al. (1995) han indicado que la modelación *in vitro* para el estudio del perfil inflamatorio es relativamente semejante a la realidad biológica, pudiendo inferir de esta forma sobre los fenómenos acaecidos *in vivo*. Durante el proceso infeccioso, las células de la inmunidad innata reconocen los patógenos generándose a posteriori su activación y con el consecuente desencadenante del proceso inflamatorio (Rainard y Riollet, 2006). Los mediadores anfitriones de la inflamación son moléculas de señalización como el óxido nítrico, prostaglandinas y citoquinas, éstas últimas mencionadas en repetidas ocasiones en el presente trabajo. La infección o estimulación *in vitro* por el grupo de microorganismos gramnegativos, los cuales expresan en su superficie la endotoxina LPS, provocan un aumento mucho más fuerte en la expresión y secreción de TNF- $\alpha$  y de otras citoquinas pro-inflamatorias que otros patógenos, como los gram-positivos, generándose así una presentación aguda y fuertemente inflamatoria en etapas tempranas de la infección (Buitenhuis et al., 2011; Schukken et al., 2011). En este sentido, Bannerman (2009) ha indicado que la infección intra-mamaria con *Staphylococcus aureus* se caracteriza por un aumento relativamente más bajo y de corta duración de las citoquinas pro-inflamatorias mientras que las infecciones de *Streptococcus uberis* muestra un patrón inicial tardío pero con una expresión muy fuerte del perfil inflamatorio. Si bien no se realizó una investigación sobre el perfil inflamatorio de acuerdo con el patógeno, el rápido incremento en las concentraciones de TNF- $\alpha$  en los cultivos celulares, puede explicarse en parte por lo mencionado *ut supra*.

El vínculo entre la endocrinología metabólica y la respuesta del sistema inmune se ha demostrado (Wathes et al., 2009; Esposito et al., 2014). La respuesta celular en términos de producción de TNF- $\alpha$  se ve afectada por el período de lactancia (Burvenich et al., 2007), y su mayor producción en la lactancia temprana ha sido reportada (Sordillo et al., 1995; Røntved et al., 2005; Khatun et al., 2017), concordando con nuestros hallazgos. El ascenso abrupto en los niveles de producción de TNF- $\alpha$  en el grupo de lactancia temprana podría explicarse por la adaptación endócrina-metabólica característica de dicho grupo durante el posparto temprano, lo que Wathes et al. (2009) han indicado como respuesta a un estado de desbalance energético y de estrés oxidativo, propio de las primeras semanas de lactancia. La regulación positiva sobre la expresión génica de las vías de respuesta inflamatoria posparto es consistente con la literatura y subraya fehacientemente que el parto y el comienzo de la lactancia están vinculados a los procesos inflamatorios (Loor et al., 2005; Bradford et al., 2009; Trevisi et al., 2015; Mann et al., 2019). En este sentido, estudios recientes han demostrado que la concentración de TNF- $\alpha$  en vacas lecheras en lactancia temprana, presenta una correlación positiva con la gravedad de la inflamación y ligada por lo tanto con la incidencia de enfermedades metabólicas e infecciosas durante dicho período (Trevisi et al., 2015).

Las señales inflamatorias están elevadas en vacas lecheras en torno al parto, siendo esta respuesta inflamatoria no necesariamente dirigida hacia una infección. Raphael y Sordillo (2013) y Bradford (2015) han indicado que el ascenso en la incidencia de enfermedades tanto metabólicas como infecciosas, puede asociarse con una respuesta pro-inflamatoria crónica durante las primeras semanas posparto en la vaca lechera, inflamación crónica que autores como Hotamisligil (2006) la han denominado «inflamación metabólica». Los cambios endócrino metabólicos ocurridos en dicho período se han relacionado con una respuesta inflamatoria crónica en la vaca lechera, debido principalmente a los incrementos de NEFA a nivel plasmático, propio del desbalance energético y consecuente movilización de reservas corporales (Suriyasathaporn et al., 1999; Bradford et al., 2015), incrementos en las concentraciones de NEFA visualizadas en nuestro grupo de lactancia temprana (Tabla 2).

Como se ha mencionado en secciones anteriores, las células del sistema inmune innato pueden ser activadas a través de una variedad de mecanismos, incluidos receptores de membrana como los TLRs, como también receptores nucleares como el receptor de activación de proliferación de peroxisomas (PPAR). Si bien parte de estos receptores se consideran más comúnmente como una herramienta del sistema inmune para la identificación de patógenos a través del reconocimiento de PAMPs, pueden ser activados por otros desencadenantes. Los ácidos grasos saturados pueden activar la señalización TLR4 en numerosas células, incluidas las PBMC en particular monocitos y macrófagos tisulares (Bradford et al., 2015). Esta activación conduce a la iniciación en la ruta de señalización transcripcional vía NF- $\kappa$ B de citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- $\alpha$  (Bradford y Swartz, 2020). Esto último puede dar sustento a la correlación encontrada entre las concentraciones de NEFA en suero y TNF- $\alpha$  en el sobrenadante de cultivos celulares a las 8 hs post-estimulación con *E. Coli* en el presente experimento (Figura 7).

Si bien el desbalance energético con incrementos en las concentraciones séricas de NEFA procedentes de la lipomovilización lipídica, puede dar respuesta a incrementos en la producción de TNF- $\alpha$  como lo visualizado en nuestro estudio, Trevisi et al. (2015) han indicado que los ácidos grasos libres también pueden activar receptores nucleares como el mencionado PPAR, el cual es participante clave de incrementar la señalización de la  $\beta$ -oxidación y de genes vinculados en la respuesta pro-inflamatoria. Si bien en este experimento no se realizaron mediciones en lo que se refiere al estatus oxidativo y el potencial redox, Putman et al. (2018) han subrayado que el potencial estrés oxidativo presente en las células mononucleares del grupo de lactancia temprana, contribuye a la exacerbación en la inflamación del mencionado. La producción de citoquinas pro-inflamatorias está relacionada al descenso en la capacidad reductora de las células y consecuente incremento de moléculas de daño relacionadas al estrés oxidativo, lo que promueve la activación de complejos multiproteicos citoplasmáticos denominados inflamomas (Sordillo, 2018).

Sin embargo, establecer la causalidad o la secuencia de eventos no es posible en nuestro diseño. En otros términos, es posible que el desafío metabólico durante el posparto provoque que el grupo de lactancia temprana tenga una mayor respuesta inflamatoria expresada por sus células inmunes, sin embargo, la exacerbación de la respuesta inflamatoria puede tener un considerable impacto en la magnitud del déficit energético. Esto último explicado por el efecto que presenta el TNF- $\alpha$  como potente citoquina pro-inflamatoria sobre la inhibición de la regulación neuro-endócrina del apetito a nivel hipotalámico, con el consecuente agravamiento de la deficiencia de ingesta y posterior

energética durante el posparto temprano (Grummer et al., 2004). En este sentido, Trevisi et al. (2015) han evidenciado mediadores inflamatorios directamente induciendo trastornos metabólicos, indicando así que la inflamación en el posparto, juntamente con el aumento del metabolismo celular y el consumo de oxígeno, incrementa aún más el estado de desbalance energético. Los efectos metabólicos de la inflamación no solo incluyen disminución del apetito, citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- $\alpha$  pueden generar incrementos en la resistencia a la insulina y estimulación directa de la lipólisis e incrementos subsecuentes de NEFA (Kushibiki et al., 2003). Por otro lado, Bradford et al. (2015) han indicado que el TNF- $\alpha$  contribuye negativamente a la producción de glucosa por parte del hígado, agravando la descompensación energética, lo que Bradford et al. (2009) han indicado como causa del aumento de la degradación del tejido adiposo con la consecuente elevación en las concentraciones séricas de NEFA. Es por ello, que si bien en este estudio reafirmamos que las concentraciones ascendentes de NEFA impactan a nivel del sistema inmune contribuyendo a la exacerbación en la producción de citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- $\alpha$ , biológicamente es dificultoso discernir cuál de los mencionados es precedente.

La mayor limitación del diseño experimental en cuestión fue el analizar una población de células mixtas, por lo que es inasequible discernir que subconjunto de células contribuye a la producción de TNF- $\alpha$  en el presente experimento. Si bien las células de la inmunidad innata como los monocitos son participes claves en la producción de TNF- $\alpha$ , se ha demostrado que los linfocitos T son sustanciales en la regulación del tono inflamatorio. Estas células pueden polarizar su respuesta fenotípica, respuesta que se define por las citoquinas producidas y las cuales definen el tono inflamatorio. En este sentido, se ha observado que los linfocitos Th (TCD4+) con un perfil Th1 («perfil pro-inflamatorio») contribuyen de manera notoria a la progresión y mantenimiento de las señales inflamatorias, contribuyendo a la producción de TNF- $\alpha$ , luego de su activación por parte de las células de la inmunidad innata (Schukken et al., 2011; Pomeroy et al., 2015). Esta polarización de la inmunidad adaptativa hacia una respuesta tipo Th1 en el posparto temprano, se transformaría hacia una respuesta tipo Th2 («anti-inflamatoria/regulatoria») durante el avance de la lactancia y más precisamente durante la gestación, mecanismo inmunológico involucrado en la interfase materno-fetal y de tolerancia inmunogénica, con el fin del mantenimiento exitoso de la gestación (Betz, 2012; Zenclussen, 2013). Si bien lo anteriormente expuesto puede dar explicación a los ascensos en las concentraciones de TNF- $\alpha$  en el grupo de lactancia temprana, consideramos que el tiempo de estimulación *in vitro* en el que las células fueron desafiadas fue limitado, tiempo innecesario para que se inicie una respuesta adaptativa por parte de los linfocitos T y más aún una polarización hacia una respuesta tipo Th1 o pro-inflamatoria. Por otro lado, se ha demostrado que la expresión de moléculas MHC de clase II en la superficie de los monocitos se encuentra con cierto grado de deterioro durante las primeras semanas de lactancia (Sordillo, 2016). En consecuencia, la capacidad funcional de los mencionados en cuanto a la presentación de antígenos exógenos a los linfocitos TCD4+, se encuentra en descenso, lo que autores como Derakhshani et al. (2018) han subrayado como perjudicial sobre el nexo entre la respuesta inmune innata y adaptativa. Cabe destacar que Bradford y Swartz (2020), han indicado que los procesos involucrados en la polarización hacia una respuesta Th1 y su impacto en el desarrollo del proceso inflamatorio permanecen con un margen de especulación. Para respaldar esta especulación, Shafer-Weaver et al. (1999) han indicado que las vacas lecheras durante el posparto se caracterizan por presentar un perfil de linfocitos T anti-inflamatorios (Th2). En este mismo sentido, Lacetera et al. (2005), indicaron que la síntesis de IFN $\gamma$ , citoquina involucrada en la diferenciación

hacia una polarización Th1, por parte de las PBMC, se correlacionó negativamente con los incrementos de NEFA durante el posparto, hallazgo biológico que da sustento al margen de especulación mencionado por Bradford y Swartz (2020). Por otro lado, Mann et al. (2019) han subrayado que los genes expresados diferencialmente durante la inflamación en el posparto temprano en la vaca lechera muestran un enfoque en la activación de las células de la inmunidad innata de origen mielóide. Por lo tanto, a pesar de trabajar con una población mixta de células inmunes proponemos que las células mieloides, particularmente monocitos, desempeñan un papel importante en la conversación cruzada del sistema metabólico e inmune y son el subconjunto de células que contribuyen de manera sustancial a los incrementos de TNF- $\alpha$  en ambos grupos en estudio. Pomeroy et al. (2017) han demostrado que el incremento de determinados grupos filogenéticos de monocitos, particularmente CD14<sup>+</sup> en el preparto, se asocia con el ascenso en el riesgo de enfermedades inflamatorias e infecciosas en el posparto temprano, marcando aún más la importancia de esta línea celular.

La inflamación al igual que el desbalance energético durante el posparto, es un proceso fisiológico normal del sistema inmune, fenómeno biológico indispensable para la reparación de tejidos luego del parto, entre los que se destaca la involución uterina (Loor et al., 2005; Sheldon et al., 2020). Sin embargo, alteraciones en los mecanismos implicados en la inducción de la inflamación, como la exacerbación en el desbalance energético, se han asociado con fenómenos inmunopatológicos alterando el estado de salud de los animales. Como se ha mencionado con anterioridad, autores como Bradford et al. (2015) han señalado la presencia de una respuesta inflamatoria metabólica en las vacas lecheras en el posparto, incluso en animales aparentemente sanos. En este sentido, los anteriormente mencionados, han indicado que el patrón de inflamación afecta de manera notoria los parámetros productivos de los animales. Es así, que una breve respuesta inflamatoria puede apoyar a las adaptaciones homeoréticas durante el posparto temprano, en cambio, el fracaso en la resolución y el consecuente mantenimiento de las señales inflamatorias, ocasionan un impacto adverso en la productividad, salud y fertilidad en los animales. Bertoni et al. (2008) y Huzzey et al. (2009) han señalado que el incremento exacerbado de marcadores pro-inflamatorios como el TNF- $\alpha$  durante el posparto temprano, ocasiona lesiones a nivel del tejido epitelial mamario con la consecuente disminución de la producción de leche y descensos en las tasas de concepción en las primeras semanas de lactancia. Concomitantemente, el TNF- $\alpha$  perjudica la síntesis de proteínas de fase aguda negativa nAPP, algunas de ellas importantes para el metabolismo normal del hígado (Bertoni y Trevisi, 2013). En este sentido, Bossaert et al. (2012) han demostrado que las bajas concentraciones de nAPP, producto del ascenso en las concentraciones de TNF- $\alpha$ , se han asociado a una disminución en la funcionalidad hepática, rendimiento productivo y un incremento en la incidencia de enfermedades. Es por ello que es necesario que el proceso inflamatorio sea controlado, proceso en el que participan señales de resolución donde se incluyen citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 (Couper et al., 2008; Schukken et al., 2011; Banchereau et al., 2012). En este sentido, Bradford et al. (2015) han propuesto la necesidad de definir y promover un grado saludable de inflamación en las vacas lecheras en el posparto, permitiendo limitar los trastornos en el período al mismo tiempo que se mejora la rentabilidad de los sistemas productivos.

En resumen, se ha propuesto que la exacerbación en la inflamación y el mantenimiento de una respuesta pro-inflamatoria latente o crónica en vacas lecheras durante el posparto temprano, contribuye a la desregulación en la funcionalidad del sistema inmune, aumentando así el riesgo a padecer trastornos infecciosos y metabólicos. Esto impacta

además de forma negativa sobre la producción láctea y vida productiva de los animales. Como se ha expuesto con anterioridad, el estrés oxidativo y el perfil de citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- $\alpha$  están involucrados en la respuesta inflamatoria, proponiéndose como participantes claves de los trastornos de salud en la vaca lechera durante la transición. En nuestro conocimiento, este fue el primer estudio que investigó la capacidad funcional de las PBMC, en términos de respuesta de TNF- $\alpha$  al desafío *in vitro* con *E. coli*, en vacas lecheras en pastoreo sanas según la etapa de lactancia. Los mecanismos precisos involucrados en la producción de TNF- $\alpha$  en la lactancia temprana requieren una mayor investigación, debido al impacto en los eventos sanitarios entre los que se encuentra la mastitis

## 9. CONCLUSIONES

El balance energético negativo reflejado a través de la evolución de la condición corporal y los perfiles endócrino-metabólicos durante el parto en vacas lecheras en sistema mixto de alimentación, se asoció con una disminución en el recuento de células del sistema inmune innato y adquirido. El perfil endócrino-metabólico fue más desequilibrado en las vacas primíparas en comparación con sus homólogas múltíparas, señalando un desbalance energético más pronunciado en dicha categoría. Sin embargo, el desbalance energético más notorio en vacas primíparas, no se visualizó sobre las concentraciones circulantes de leucocitos, ya que la paridad no afectó dichas variables.

La producción de TNF- $\alpha$  luego del desafío *in vitro* con *E. coli*, fue mayor y más rápida en el grupo de lactancia temprana que en el grupo de lactancia media, cuando las PBMC se co-cultivaron con suero autólogo, lo que concuerda con el estado pro-inflamatorio de la lactancia temprana. La respuesta a la estimulación dependió del tipo de suero en el que se co-cultivaron las células, ya que al ser reemplazado el suero autólogo con el suero fetal bovino, la etapa de lactancia presentó una producción de TNF- $\alpha$  similar, lo que sugiere que el entorno (endócrino-metabólico) desempeña un papel importante en la capacidad de respuesta de las células mononucleares.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas A., Lichman A., Pillai S. (2017). Cellular and Molecular Immunology. 9<sup>th</sup> Edition, USA. Elsevier.
- Adrien M.L., Mattiauda D.A., Artegoitia V., Carriquiry M., Motta G., Bentancur O., Meikle A. (2012). Nutritional regulation of body condition score at the initiation of the transition period in primiparous and multiparous dairy cows under grazing conditions: milk production, resumption of post-partum ovarian cyclicity and metabolic parameters. *Animal*, 6(2): 292-299.
- Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124: 783-801.
- Astessiano A.L., Chilibroste P., Fajardo M., Laporta J., Gil J., Mattiauda D., Meikle A., Carriquiry M. (2012). Hepatic expression of GH-IGF axis genes in Holstein cows with different nutritional managements during early lactation. *Journal of Dairy Science*, 95(E-Suppl 2): 348-357.
- Banchereau J., Pascual V., O'Garra A. (2012). From IL-2 to IL-37: The expanding spectrum of anti-inflammatory cytokines. *Natural Immunology*, 13: 925-931.
- Bannerman D.D., Paape M.J., Lee J.W., Zhao X., Hope J.C., Rainard P. (2004). *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Elicit Differential Innate Immune Response following Intramammary Infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11: 463-472.
- Bannerman D.D. (2009). Pathogen-dependent induction of cytokines and soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. *Journal of Animal Science*, 87: 10-25.
- Barca J., Schukken Y.H., Meikle A. (2020). Modulation of immune cells by Pegbovigrastim in healthy and diseases primiparous and multiparous grazing dairy cows and its association with metabolism. (unpublished)
- Bargo F., Müller L.D., Delahoy J.E., Cassidy T.W. (2002). Performance of high producing dairy cows with three different feeding systems combining pasture and total mixed rations. *Journal of Dairy Science*, 85(11): 2948-2963.
- Barkema H.W., Schukken Y.H., Lam T.J., Beiboer M.L., Wilmink H., Benedictus G., Brand A. (1998). Incidence of clinical mastitis in dairy herd grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. *Journal of Dairy Science*, 81: 411-419.
- Bauman D.E. and Currie W.B. (1980). Partitioning of Nutrients during Pregnancy and Lactation: A Review of Mechanisms Involving Homeostasis and Homeorhesis. *Journal of Dairy Science*, 63: 1514-1529.
- Bauman D.E. (2000). Regulation of nutrient partitioning during lactation: homeostasis and homeorhesis revisited. In: Cronjé P.B. *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism and Growth, and Reproduction*. New York, ed. PJ Cronje, pp. 311-27.
- Bauman D.E., Mather I.H., Wall R.J., Lock A.L. (2006). Major Advances Associated with the Biosynthesis of Milk. *Journal of Dairy Science*, 89: 1235-1243.
- Beagley J.C., Whitman K.J., Baptiste K.E., Scherzer J. (2010). Physiology and treatment of retained fetal membranes in cattle. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24: 261-268.
- Bell A.W. (1995a). Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of Animal Science*, 73: 2804-2819.



- Bell A.W., Slepetic R., Ehrhardt R.A. (1995b). Growth and accretion of energy and protein in the gravid uterus during late pregnancy in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 78: 1954-1961.
- Bernabucci U., Ronchi B., Lacetera N., Nardone A. (2005). Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 88: 2017-2026.
- Bertics S.J., Grummer R.R., Cadorniga-Valino C., Stoddard E.E. (1992). Effect of prepartum dry matter intake on liver triglyceride concentration and early lactation. *Journal of Dairy Science*, 75: 1914-1922.
- Bertoni G., Trevisi E., Han X., Bionaz M. (2008). Effects of inflammatory condition on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 91: 3300-3310.
- Bertoni G. and Trevisi E. (2013). 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: 413-431.
- Betz A.G. (2012). Immunology: Tolerating pregnancy. *Nature*, 490: 47-48.
- Bionaz M., Trevisi E., Calamari L., Librandi F., Ferrari A., Bertoni G. (2007). Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 90: 1740-1750.
- Block E. (1984). Manipulating Dietary Anions and Cations for Prepartum Dairy Cows to Reduce Incidence of Milk Fever. *Journal of Dairy Science*, 67: 2939-2948.
- Block S.S., Butler W.R., Ehrhardt R.A., Bell A.W., Van Amburgh M.E., Boisclair Y.R. (2001). Decreased concentration of plasma leptin in periparturient dairy cows is caused by negative energy balance. *Journal of Endocrinology*, 171: 339-348.
- Bosseart P., Trevisi E., Opsomer G., Bertoni G., De Vliegher S., Leroy L.M. (2012). The association between indicators of inflammation and liver variables during the transition period in heugh-yielding dairy cows: An observational study. *The Veterinary Journal*, 192: 222-225.
- Bradford B.J., Mamedova L.K., Minton J.E., Drouillard J.S., Johnson B.J. (2009). Daily injection of tumor necrosis factor- $\alpha$  increases hepatic triglycerides and alters transcript abundance of metabolic genes in lactating dairy cattle. *Journal of Nutrition*, 139: 1451-1456.
- Bradford B.J., Yuan K., Farney J.K., Mamedova L.K., Carpenter A.J. (2015). Invited review: Inflammation during the transition to lactation: New adventures with an old flame. *Journal of Dairy Science*, 98: 6631-6650.
- Bradford B.J. and Swartz T.H. (2020). Review: Following the smoke signals: inflammatory signaling in metabolic homeostasis and homeorhesis in dairy cattle. *Animal*, 14: 144-154.
- Bradley A.J. and Green M.J. (2001). Adaptation of *Escherichia coli* to the bovine mammary gland. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 1845-1849.
- Broster W.H., Broster J.J., Clements A.J. (1993). Feed utilization by the dairy cow over multiple lactations: a review. *Livestock Production Science*, 34: 1-21.
- Buitenhuis B., Rontved C.M., Edwards S.M., Ingvarsen K.L., Sorensen P. (2011). In depth analysis of genes and pathways of the mammary gland involved in the pathogenesis of bovine *Escherichia coli*-mastitis. *BMC Genomics*, 12: 130-140.
- Burton J.L., Kehrl M.E., Kapil S., Horst R.L. (1995). Regulation of L-selectin and CD18 on bovine neutrophils by glucocorticoids: Effects of cortisol and dexamethasone. *Journal of Leukocyte Biology*, 57: 317-325.
- Burton J.L., Madsen S.A., Yao J., Sipkovsky S.S., Coussens P.M. (2001). Immunogenomics approach to understanding periparturient immunosuppression

- and mastitis susceptibility in dairy cows. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 42: 407-424.
- Burton J.L. and Erskine R.J. (2003). Immunity and mastitis. Some new ideas for an old disease. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 19: 1-45.
- Burvenich C., Van Merris V., Mehrzad J., Diez-Fraile A., Duchateau L. (2003). Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factor. *Veterinary Research*, 34: 521-564.
- Burvenich C., Bannerman D.D., Lippolis J.D., Peelman L., Nonnecke B.J., Kehrl J. M.E., Paape M.J. (2007). Cumulative physiological events influence the inflammatory response of the bovine udder to *Escherichia coli* infections during the transition period. *Journal of Dairy Science*, 90: 39-54.
- Cai T.Q., Weston P.G., Lund L.A., Brodie B., McKenna D.J., Wagner W.C. (1994). Association between neutrophil functions and periparturient disorders in cows. *American Journal of Veterinary Research*, 55: 934-943.
- Carriquiry M., Adrien L., Artegoitia V., Mattiauda D., Meikle A. (2010). Nutritional regulation of body condition score at the initiation of the transition period in dairy cows on grazing condition: hepatic expression of fatty acid metabolism genes. *Journal of Dairy Science*, 93: 390-399.
- Cavatorta D.J., Erb H.N., Flaminio M.J.B.F. (2009). Ex vivo generation of mature equine monocyte-derived dendritic cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 131 (3): 259-267.
- Cavestany D., Blanc J.E., Kulcsar M., Uriarte G., Chilibroste P., Meikle A., Febel H., Ferraris A., Krall E. (2005). Studies of the transition cow under a pasture based milk production system: metabolic profiles. *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medical*, 52(1): 1-7.
- Cavestany D., Kulcsar M., Crespi D., Chilliard Y., La Manna A., Balogh O., Keresztes M., Delavaud C., Huszenicza G., Meikle A. (2009). Effect of prepartum energetic supplementation on productive and reproductive characteristics, and metabolic and hormonal profiles in dairy cows under grazing conditions. *Reproduction in Domestic Animal*, 44: 663-671.
- Chapinal N., Carson M.E., LeBlanc S.J., Leslie K.E., Godden S., Capel M., Santos J.E.P., Overton M.W., Duffield T.F. (2012). The association of Serum metabolites in the transition period with milk production and early lactation reproductive performance. *Journal of Dairy Science*, 95: 1301-1309.
- Chilibroste P., Soca P., Mattiauda D.A. (2011) Balance entre oferta y demanda de nutrientes en sistemas pastoriles de producción de leche: potencial de intervención al inicio de la lactancia. XV Congreso Latinoamericano de Buiatría, XXXIX Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay. 8-10 Junio 2011. pp. 91-97.
- Chilibroste P., Soca P., Mattiauda D.A. (2012). Estrategias de alimentación en Sistemas de Producción de Leche de base pastoril. *Pasturas 2012: Hacia una ganadería competitiva y sustentable*. Balcarce: INTA. pp. 91-100.
- Chilliard Y. (1999). Metabolic adaptations and nutrient partitioning in the lactating animal. In *Biology of Lactation* pp 503-552. Eds. J Martinet L.M. Houdebine & H.H. Head. Paris.
- Collins R.A., Howard C.J., Duggan S.E., Werling D. (1999). Bovine interleukin-12 and modulation of IFN gamma production. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 68: 193-207.
- Cooper M.D. and Alder M.N. (2006). The Evolution of Adaptive Immune Systems. *Cell*, 124: 815-822.

- Couper K.N., Blount D.G., Riley E.M. (2008). IL-10: The master regulator of immunity to infection. *The Journal of Immunology*, 180: 5771-5777.
- Crookenden M.A., Moyes K.M., Kuhn-Sherlock B., Lehnert K., Walker C.G., Looor J.J., Mitchell M.D., Murray A., Dukkipati V.S.R., Vailati-Riboni M., Heiser A., Roche J.R. (2019). Transcriptomic analysis of circulating neutrophils in metabolically stressed periparturient grazing dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 102: 7408-7420.
- Cruz I. (2019). Incidencia de enfermedades durante la lactancia temprana y su relación con la paridad y tamaño de rodeo. Tesis de Maestría, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay.
- Curtis C.R., Erb H.N., Sniffen C.J., Smith R.D., Kronfeld D.S. (1985). Path analysis of dry period nutrition, postpartum metabolic and reproductive disorders, and mastitis in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 68: 2347-2360.
- De Koster J., Hostens M., van Ertvelde M., Hermans K., Moerman S., Bogaert H., Depreester E., van den Broeck W., Opsomer G. (2015). Insulin response of the glucose and fatty acid metabolism in dry dairy cows across a range of body condition scores. *Journal of Dairy Science*, 98: 4580-4592.
- De Koster J., Urh C., Hostens M., van den Broeck W., Sauerwein H., Opsomer G. (2017). Relationship between serum adiponectin concentration, body condition score, and peripheral tissue insulin response of dairy cows during the dry period. *Domestic Animal Endocrinology*, 59: 100-104.
- Delavaud C., Bocquier F., Chilliard Y., Keisler D.H., Gertler A., Kann G. (2000). Plasma leptin determination in ruminants: effect of nutritional status and body fatness on plasma leptin concentration assessed by a specific RIA in sheep. *Journal of Endocrinology*, 165: 519-526.
- Derakhshani H., Fehr K.B., Sepehri S., Francoz D., De Buck J., Barkema H.W., Plaizier C., Khafipour E. (2018). Invited review: Microbiota of the bovine udder: Contributing factors and potential implications for udder health and mastitis susceptibility. *Journal of Dairy Science*, 101: 10605-10625.
- Detilleux J.C., Kehrl M.E., Stabel J.R., Freeman A.E., Kelley D.H. (1995). Study of immunological dysfunction in periparturient Holstein cattle selected for high and average milk production. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 44: 251-267.
- De Vliegher S., Fox L.K., Piepers S., Mc Dougall S., Barkema H.W. (2012). Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the diseases, potential impact, prevention and control. *Journal of Dairy Science*, 95: 1025-1040.
- DIEA (2019). Anuario Estadístico Agropecuario, MGAP, Montevideo, Uruguay. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-organizativa/oficina-de-programación-y-políticas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-diea>. Acceso 24 de noviembre de 2018.
- Dogan B., Klaessig S., Rishniw M., Almeida R.A., Oliver S.P., Simpson K., Schukken Y.H. (2006). Adherent and invasive *Escherichia coli* are associated with persistent bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 116: 270-282.
- Doherty R., O'Farrelly C., Meade K.G. (2013). Epigenetic regulation of the innate immune response to LPS in bovine peripheral blood mononuclear cells (PBMC). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 154: 102-110.
- Drackley J.K. (1999). Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier?. *Journal of Dairy Science*, 82: 2259-2273.

- Drackley J.K., Overton T.R., Douglas G.N. (2001). Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. *Journal of Dairy Science*, 84: 100-112.
- Drackley J.K., Dann H.M., Douglas N., Janovick Guretzky N.A., Litherland N.B., Underwood J.P., Looor J.J. (2005). Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. *Italian Journal of Animal Science*, 4: 323-344.
- Duffield F., Lissemore K.D., McBride B.W., Leslie K.E. (2009). Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *Journal of Dairy Science*, 92: 571-580.
- Edmonson A.J., Lean I.J., Weaver L.D., Farver T., Webster G. (1989). A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 72: 68-78.
- Ehrhardt R., Slepatis R., Siegal-Willott J., Van Amburgh M., Bell A., Boisclair Y. (2000). Development of a specific radioimmunoassay to measure physiological changes of circulating leptin in cattle and sheep. *Journal of Endocrinology*, 166: 519-528.
- Elazar S., Gonen E., Livneh-Kol A., Rosenshine I., Shpigel N.Y. (2010). Essential role of neutrophil but not mammary alveolar macrophages in a murine model of acute *Escherichia coli* mastitis. *Veterinary Research*, 41: 53-65.
- Esposito G., Irons P.C., Webb E.C., Chapwanya A. (2014). Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 144: 60-71.
- Farber D.L., Netea M.G., Radbruch A., Rajewsky K., Zinkernagel R.M. (2016). Immunological memory: lessons from the past and a look to the future. *Nature Reviews Immunology*, 16: 124-128.
- Fariña S.R. and Chilibróste P. (2019). Opportunities and challenges for the growth of milk production from pasture: The case of farm systems in Uruguay. *Journal of Agricultural Systems*, 176: 102631.
- Franklin S.T., Young J.W., Nonnecke B.J. (1991). Effects of ketones, acetate, butyrate and glucose on bovine lymphocyte proliferation. *Journal of Dairy Science*, 74: 2507-2514.
- Gärtner T., Gernand E., Gottschalk J., Donat K. (2019). Relationships between body condition, body condition loss, and serum metabolites during the transition period in primiparous and multiparous cows. *Journal of Dairy Science*, 102: 9187-9199.
- George J.W., Shipes J., Lane M. (2010). Comparison of bovine hematology reference intervals from 1957 to 2006. *Veterinary Clinical Pathology*, 39: 138-148.
- Gillund P., Reksen O., Gröhn Y.T., Karlberg K. (2001). Body condition related to ketosis and reproductive performance in Norwegian dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 84: 1390-1396.
- Goff J.P. and Horst R.L. (1997). Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *Journal of Dairy Science*, 80: 1260-1268.
- Goff J.P. (2006). Major advances in our understanding of nutritional influences on bovine health. *Journal of Dairy Science*, 89: 1292-1301.
- Grant R.J. and Albright J.L. (2001). Effects of animal grouping on feeding behavior and intake of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 84: 156-163.
- Gröhn Y.T., Wilson D.J., González R.N., Hertl J.A., Schulte H., Bennett G., Schukken Y.H. (2004). Effects of pathogen-specific clinical mastitis on milk yield in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 87: 3358-3374.

- Gross J.J., Kessler E.C., Albrecht C., Bruckmaier R.M. (2015). Response of the cholesterol metabolism to a negative energy balance in dairy cows depends on the lactational stage. *PLoS One*, 10 (6): e0121956.
- Grum D.E., Drackley J.K., Clark J.H. (2002). Fatty acid metabolism in liver of dairy cows fed supplemental fat and nicotinic acid during an entire lactation. *Journal of Dairy Science*, 85: 3026-3034.
- Grummer R.R. (1995). Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *Journal of Animal Science*, 73: 2820-2833.
- Grummer R.R., Mashek D.G., Hayirli A. (2004). Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 20 (3): 447-470.
- Gurjar A.A., Klaessig S., Salmon S.A., Yancey J., Robert J., Schukken Y.H. (2013). Evaluation of an alternative dosing regimen of a J-5 mastitis vaccine against intramammary *Escherichia coli* challenge in nonlactating late-gestation dairy cow. *Journal of Dairy Science*, 96: 5053-5062.
- Hachenberg S., Weinkauf C., Hiss S., Sauerwein H. (2007). Evaluation of classification modes potentially suitable to identify metabolic stress in healthy dairy cows during the periparturient period. *Journal of Animal Science*, 85: 1923-1932.
- Hammon D.S., Evjen I.M., Dhiman T.R., Goff J.P., Walters J.L. (2006). Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 113: 21-29.
- Han van der Kolk J.H., Gross J.J., Gerber V., Bruckmaier R.M. (2017). Disturbed bovine mitochondrial lipid metabolism: A review. *Veterinary Quarterly*, 37: 262-273.
- Hassfurth R.L., Terhune T.N., Canning P.C. (2015). Efficacy of polyethylene glycol conjugated bovine granulocyte colony-stimulating factor for reducing the incidence of naturally occurring clinical mastitis in periparturient dairy cows and heifers. *American Journal of Veterinary Research*, 76: 231-238.
- Herd T.H. (2000). Ruminant adaptation to negative energy balance. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 16: 215-230.
- Hertl J.A., Gröhn Y.T., Leach D.G., Bar D., Bennett G.J., González R.N., Rauch B.J., Welcome F.L., Tauer L.W., Schukken Y.H. (2010). Effects of clinical mastitis caused by gram-positive and gram-negative bacteria and other organisms on the probability of conception in New York State Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93: 1551-1560.
- Heuer C., Schukken Y.H., Dobbelaar P. (1999). Postpartum body condition score and results from the first test day milk as predictors of disease, fertility, yield, and culling in commercial dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 82: 295-304.
- Hirschfeld M., Weis J.J., Toshchakov V. (2001). Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonist result in differential gene expression in murine macrophages. *Infection and Immunology*, 69: 1477-1482.
- Hoeben D., Monfardini E., Opsomer G., Burvenich C., Dosogne H., De Kruif A., Beckers J.F. (2000). Chemiluminescence of bovine polymorphonuclear leucocytes during the periparturient period and relation with metabolic markers and bovine pregnancy-associated glycoprotein. *Journal of Dairy Science*, 67: 249-259.
- Holtenius K., Agenas S., Delavaud C., Chilliard Y. (2003). Effects of feeding intensity during the dry period. Metabolic and hormonal responses. *Journal of Dairy Science*, 86: 883-891.

- Horst R.L., Goff J.P., Reinhardt T.A. (1997). Strategies for preventing milk fever in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 80: 1269-1280.
- Hotamisligil G.S., Shargill N.S., Spiegelman B.M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 259: 87-91.
- Hotamisligil G.S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444: 860-867.
- Houe H., Ostergaard S., Thilising-Hansen T., Jorgensen R.J., Larsen T., Sorensen J.T., Agger J.F., Blom J.Y. (2001). Milk fever and subclinical hypocalcemia – An evaluation of parameters on incidence risk, diagnosis, risk factors and biological effects as input for a decision support system for disease control. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 42: 1-29.
- Houseknecht K.L., Portocarrero C.P., Ji S., Lemenager R., Spurlock M.E. (2000). Growth hormone regulates leptin gene expression in bovine adipose tissue: correlation with adipose IGF-I expression. *Journal of Endocrinology*, 164: 51-57.
- Huzzey J.M., Duffield T.F., LeBlanc S.J., Veira D.M., Weary D.M., von Keyserlingk M.A.G. (2009). Short communication: Haptoglobin as an early indicator of metritis. *Journal of Dairy Science*, 92: 621-625.
- Ingvartsen K.L. and Andersen J.B. (2000). Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. *Journal of Dairy Science*, 83: 1573-1597.
- Ingvartsen K.L. and Boisclair Y.R. (2001). Leptin and the regulation of food intake, energy homeostasis and immunity with special focus on periparturient ruminants. *Domestic Animal Endocrinology*, 21(4): 215-250.
- Ingvartsen K.L., Dewhurst R.J., Friggens N.C. (2003). On the relationship between lactational performance and health: Is it yield or metabolic imbalance that causes production diseases in dairy cattle? A position paper. *Livestock Production Science*, 83: 277-308.
- Ingvartsen K.L. (2006). Feeding and management-related diseases in the transition cow: Physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding-related diseases. *Animal Feed Science and Technology*, 126: 175-213.
- Ingvartsen K.L. and Moyes K.M. (2013). Nutrition, immune function and health of dairy cattle. *Animal*, 7 (Suppl. 1): 112-122.
- Ingvartsen K.L. and Moyes K.M. (2015). Factors contributing to immunosuppression in the dairy cow during the periparturient period. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 63 (Supplement 1): 15-24.
- Kadokawa H., Blache D., Yamada Y., Martin G.B. (2000). Relationships between changes in plasma concentrations of leptin before and after parturition and the timing of first post-partum ovulation in high-producing Holstein dairy cows. *Reproduction Fertility and Development*, 12: 405-411.
- Kehrli M.E., Nonnecke B.J., Roth J.A. (1989a). Alterations in bovine lymphocyte function during the periparturient period. *American Journal of Veterinary Research*, 50: 215-220.
- Kehrli M.E. and Goff J.P. (1989b). Periparturient hypocalcemia in cows: Effects on peripheral blood neutrophil and lymphocyte function. *Journal of Dairy Science*, 72: 1188-1196.
- Kehrli M.E., Neill J.D., Burvenich C., Goff J.P., Lippolis J.D., Reindardt T.A., Nonnecke B.J. (2006). Energy and protein effects on the immune system: Ruminant Physiology: digestion, metabolism and impact of nutrition on gene

- expression, immunology and stress. Wageningen Academic Publishers, pp. 455-471.
- Kennedy J., Dillon P., Delaby L., Faverdin P., Stakelum G., Rath M. (2003). Effect of Genetic Merit Concentrate Supplementation on Grass Intake and Milk Production with Holstein Friesian Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 86: 610-621.
- Khatun M., Jorgensen H.B.H., Ehsani A., Lund M.S., Sahana G., Sorensen P., Rontved C.M. (2017). Whole blood optimization and genetic association of ex vivo TNF- $\alpha$  responsiveness to killed E. coli in Danish Holstein cows. *Livestock Science*, 201: 92-98.
- Kimura K., Goff J.P., Kehrl M.E. Jr, Reinhardt T.A. (2002). Decreased neutrophil function as a cause of retained placenta in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 85: 544-550.
- Kimura K., Goff J.P., Canning P., Wang C., Roth J.A. (2014). Effect of recombinant bovine granulocyte colony-stimulating factor covalently bound to polyethylene glycol injection on neutrophil number and function in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 97: 4842-4851.
- Kobayashi Y., Boyd C.K., Bracken C.J., Lamberson W.R., Keisler D.H., Lucy M.C. (1999). Reduced growth hormone receptor (GHR) messenger ribonucleic acid in liver of periparturient cattle is caused by a specific down-regulation of GHR 1A that is associated with decreased insulin-like growth factor I. *Endocrinology*, 140: 3947-3954.
- Kolver E.S. and Müller L.D. (1998). Performance and nutrient intake of high producing Holstein cows consuming pasture or a total mixed ration. *Journal of Dairy Science*, 81 (5): 1403-1411.
- Kristensen N.B. (2005). Splanchnic metabolism of volatile fatty acids in the dairy cow. *Animal Science*, 80: 3-10.
- Krumm C.S., Giesy S.L., Caixeta L.S., Butler W.R., Sauerwein H., Kim J.W., Boisclair Y.R. (2017). Effect of hormonal and energy-related factors on plasma adiponectin in transition dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100: 9418-9427.
- Kuhla B., Metges C.C., Hammon H.M. (2016). Endogenous and dietary lipids influencing feed intake and energy metabolism of periparturient dairy cows. *Domestic Animal Endocrinology*, 56: 2-10.
- Kushibiki S., Hodate K., Shingu H., Obara Y., Touno E., Shinoda M., Yokomizo Y. (2003). Metabolic and lactational responses during recombinant bovine tumor necrosis factor- $\alpha$  treatment in lactating cows. *Journal of Dairy Science*, 86: 819-827.
- Lacetera N., Scalia D., Franci O., Bernabucci U., Ronchi B., Nardone A. (2004). Short communication: Effects of Nonesterified Fatty Acids on Lymphocyte Function in Dairy Heifers. *Journal of Dairy Science*, 87: 1012-1014.
- Lacetera N., Scalia D., Bernabucci U., Ronchi B., Pirazzi D., Nardone A. (2005). Lymphocyte functions in overconditioned cows around parturition. *Journal of Dairy Science*, 88: 2010-2016.
- Laeger T., Sauerwein H., Tuchscherer A., Bellmann O., Metges C.C., Kuhla B. (2013). Concentrations of hormones and metabolites in cerebrospinal fluid and plasma of dairy cows during the periparturient period. *Journal of Dairy Science*, 96: 2883-2893.
- LeBlanc S.J. (2010). Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *Journal of Reproduction and Development*, 56: 29-35.

- LeBlanc S.J. (2020). Review: Relationships between metabolism and neutrophil function in dairy cows in the peripartum period. *Animal*, 14 (S1): 44-54.
- Lippolis J.D. (2008). Immunological signaling networks: Integrating the body immune response. *Journal of Animal Science*, 86: 53-63.
- Lippolis J., Brunelle B., Reinhardt T., Sacco R., Nonnecke B., Dogan B., Simpson K., Schukken Y. (2014). Proteomic analysis reveals protein expression differences in *Escherichia coli* strains associated with persistent versus transient mastitis. *Journal of Proteomics*, 108: 373-381.
- Loor J.J., Dann H.M., Everts R.E., Oliveira R., Green C.A., Janovick Guretzky N.A., Rodriguez-Zas S.L., Lewin H.A., Drackley J.K. (2005). Temporal gene expression profiling of liver periparturient dairy cows reveals complex adaptive mechanisms in hepatic function. *Physiological Genomics*, 23: 217-226.
- Loor J.J., Everts R.E., Bionaz M., Dann H.M., Morin D.E., Oliveira D.E., Rodriguez-Zas S.L., Drackley J.K., Lewin H.A. (2007). Nutrition-induced ketosis alters metabolic and signaling gene networks in liver of periparturient dairy cows. *Physiological Genomics*, 32: 105-116.
- Lucy M., Jiang H., Kobayashi Y. (2001). Changes in the somatotrophic axis associated with the initiation of lactation. *Journal of Dairy Science*, 84: 113-119.
- Mallard B.A., Dekkers J.C., Ireland M.J., Leslie K.E., Sharif S., Vankampen C.L., Wagter L., Wilkie B.N. (1998). Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. *Journal of Dairy Science*, 81: 585-595.
- Mann S., Nydam D.V., Abuelo A., Leal Yepes F.A., Overton T.R., Wakshlag J.J. (2016). Insulin signaling, inflammation, and lipolysis in subcutaneous adipose tissue of transition dairy cows either overfed energy during the prepartum period or fed a controlled-energy diet. *Journal of Dairy Science*, 99: 6737-6752.
- Mann S., Sipka A.S., Grenier J.K. (2019). The degree of postpartum metabolic challenge in dairy cows is associated with peripheral blood mononuclear cell transcriptome changes of the innate immune system. *Developmental and Comparative Immunology*, 93: 28-36.
- McArt J.A., Nydam D.V., Oetzel G.R., Overton T.R., Ospina P.A. (2013). Elevated non-esterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate and their association with transition dairy cow performance. *The Veterinary Journal*, 198: 560-570.
- McDougall S., Parker K.I., Heuer C., Compton C.W.R. (2009). A review of prevention and control of heifer's mastitis via non-antibiotic strategies. *Veterinary Microbiology*, 134: 177-185.
- McDougall S., LeBlanc S., Heiser A. (2017). Effect of prepartum energy balance on neutrophil function following pegbovigrastim treatment in periparturient cows. *Journal of Dairy Science*, 100: 7478-7492.
- Medzhitov R. and Janeway Jr. C. (2000). Innate immune recognition: mechanism and pathways. *Immunological Reviews*, 173: 89-97.
- Medzhitov R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454: 428-435.
- Meganck V., Goddeeris B.M., De Campeneere S., Hostens M., Van Eetvelde M., Piepers S., Cox E., Opsomer G. (2015). Effect of  $\beta$ -hydroxybutyric acid, parity, and body condition score on phenotype and proliferative capacity of colostral mononuclear leukocytes of high-yielding dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 98: 6782-6791.



- Mehrzad J., Janssen D., Duchateau L., Burvenich C. (2008). Increase in *Escherichia coli* inoculums dose accelerates CD8+ T-cell trafficking in the primiparous bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science*, 91: 193-201.
- Meikle A., Kulcsar M., Chilliard Y., Febel H., Delavaud C., Cavestany D., Chilbroste P. (2004). Effects of parity and body condition at parturition on endocrine and reproductive parameters of the cow. *Reproduction*, 127: 727-737.
- Meikle A., Adrien L., Mattiauda D., Chilbroste P. (2013a). Effects of sward condition on metabolic endocrinology during early postpartum period in primiparous grazing dairy cows and its association with productive and reproductive performance. *Animal Feed Science and Technology*, 186: 139-147
- Meikle A., Cavestany D., Carriquiry M., Adrien M.L., Artegoitia V., Pereira I., Rupprechter G., Pessina P., Rama G., Fernández A., Breijo M., Laborde D., Pritsch O., Ramos J.M., de Torres E., Nicolini P., Mendoza A., Dutour J., Fajardo M., Astessiano A.L., Olazábal L., Mattiauda D., Chilbroste P. (2013b). Avances en el conocimiento de la vaca lechera durante el período de transición en Uruguay: un enfoque multidisciplinario. *Agrociencia Uruguay*, 17 1: 141-152.
- Mielenz M., Mielenz B., Singh S.P., Kopp C., Heinz J., Haussler S., Sauerwein H. (2013). Development, validation, and pilot application of a semiquantitative Western blot analysis and an ELISA for bovine adiponectin. *Domestic Animal Endocrinology*, 44: 121-130.
- Miglior F., Fleming A., Malchiodi F., Brito L.F., Martin P., Baes C.F. (2017). A 100-Year Review: Identification and genetic selection of economically important traits in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 100: 10251-10271.
- Minuti A., Jahan N., Lopreiato V., Piccioli-Cappelli F., Bomba L., Capomaccio S., Loor J.J., Ajmone-Marsen P., Trevisi E. (2020). Evaluation of circulating leukocyte transcriptome and its relationship with immune function and blood markers in dairy cows during the transition period. *Functional Integrative Genomics*, 20: 293-305.
- Monfardini E., Paape M., Wang Y., Capuco A., Husheem M., Wood L., Burvenich C. (2002). Evaluation of L-selectin expression and assessment of protein tyrosine phosphorylation in bovine polymorphonuclear neutrophil leukocytes around parturition. *Veterinary Research*, 33: 271-281.
- Moretti P., Probo M., Cantoni A., Paltrinieri S., Giordano A. (2016). Fluctuation of neutrophil counts around parturition in Holstein Dairy cows with and without retained placenta. *Research in Veterinary Science*, 107: 207-212.
- Moyes K.M., Drackley J.K., Salak-Johnson J.L., Morin D.E., Hope J.C., Loor J.J. (2009). Dietary-induced negative energy balance has minimal effects on innate immunity during a *Streptococcus uberis* mastitis challenge in dairy cows during mid lactation. *Journal of Dairy Science*, 92: 4301-4316.
- Naya H., Urioste J.I., Chilbroste P. (2002). Evaluación cuantitativa de curvas de lactancia de vacas holando en Uruguay. Ajuste de un modelo bifásico. *Revista Argentina de Producción Animal*, 22 (supl. 1): 357-358.
- Netea M.G., Balkwill F., Chonchol M., Cominelli F., Donath M.Y., Giamarellos-Bourboulis E.J., Golenbock D., Gresnigt M.S., Heneka M.T., Hoffman H.M. (2017). A guiding map for inflammation. *Nature Immunology*, 18: 826-831.
- Newman A.W., Miller A., Leal Yepes L.A., Bitsko E., Nydam D., Mann S. (2019). The effect of the transition period and postpartum body weight loss on macrophage infiltrates in bovine subcutaneous adipose tissue. *Journal of Dairy Science*, 102: 1693-1701.

- Nightingale C.R., Matthew D., Sellers D., Ballou M.A. (2015). Elevated plasma haptoglobin concentrations following parturition are associated with elevated leukocyte responses and decreased subsequent reproductive efficiency in multiparous Holstein dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 164: 16-23.
- Nonnecke B.J., Kimura K., Goff J.P., Kehrl M.E. (2003). Effects of the mammary gland on functional capacities of blood mononuclear leukocyte populations from periparturient cows. *Journal of Dairy Science*, 86: 2359-2368.
- NRC (2001) 'Nutrient requirements of dairy cattle.' 7th rev. edn. (National Academy Press: Washington, DC).
- Ospina P.A., Nydam D.V., Stokol T., Overton T.R. (2010a). Association between the proportion of sampled transition cows with increased nonesterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate and disease incidence, pregnancy rate, and milk production at the herd level. *Journal of Dairy Science*, 93: 3595-3601.
- Ospina P.A., Nydam D.V., Stokol T., Overton T.R. (2010b). Evaluation of nonesterified fatty and  $\beta$ -hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeast United States: Critical threshold for prediction of clinical diseases. *Journal of Dairy Science*, 93: 546-554.
- Ospina P.A., McArt J.A., Overton T.R., Stokol T., Nydam D.V. (2013). Using nonesterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate concentrations during the transition period for herd-level monitoring of increased risk of disease and decreased reproductive and milking performance. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 29: 387-412.
- Overton T.R. and Waldron M.R. (2004). Nutritional management of transition dairy cows: Strategies to optimize metabolic health. *Journal of Dairy Science*, 87: 105-119.
- Overton T.R., McArt J.A., Nydam D.V. (2017). A 100-year review: Metabolic health indicators and management of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 100: 10398-10417.
- Paape M., Mehrzad J., Zhao X., Detilleux J., Burvenich C. (2002). Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 7: 109-121.
- Perkins K.H., VandeHaar M.J., Burton J.L., Liesman J.S., Erskine R.J., Elsasser T.H. (2002). Clinical response to intramammary endotoxin infusion in dairy cows subjected to feed restriction. *Journal of Dairy Science*, 85: 1724-1731.
- Pires J.A., Delavaud C., Faulconnier Y., Pomiès D., Chilliard Y. (2013). Effects of body condition score at calving on indicators of fat and protein mobilization of periparturient Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*, 96: 6423-6439.
- Poltorak A., He X., Smirnova I., Liu M.Y., Van Huffel C., Birdwell D., Alejos E., Silva M., Galanos C., Freudenberg M., Ricciardi-Castagnoli P., Layton B., Beutler B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 282: 2085-2088.
- Pomeroy B., Sipka A., Klaessig S., Schukken Y.H. (2015). Monocyte-derived dendritic cells from late gestation cows have an impaired ability to mature in response to *E. coli* stimulation in a receptor and cytokine-mediated fashion. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 167: 22-29.

- Pomeroy B., Sipka A., Klaessig S., Schukken Y.H. (2016). Longitudinal characterization of bovine monocyte-derived dendritic cells from mid-gestation into subsequent lactation reveals in phenotypic maturation and macrophage-like cytokine profile in late gestation. *Journal of Reproductive Immunology*, 118: 1-8.
- Pomeroy B., Sipka A., Hussen J., Brede M., Schukken Y., Schuberth H. (2017). Count of bovine monocyte subsets prior to calving are predictive for postpartum occurrence of mastitis and metritis. *Veterinary Research*, 48: DOI: 10.1186/s13567-017-0415-8.
- Putman A.K., Brown J.L., Gandy J.C., Wisnieski L., Sordillo M. (2018). Changes in biomarkers of nutrient metabolism, inflammation, and oxidative stress in dairy cows during the transition into the early dry period. *Journal of Dairy Science*, 101: 9350-9359.
- Quesnell R.R., Klaessig S., Watts J.L., Schukken Y.H. (2012) Bovine intramammary *Escherichia coli* challenge infections in late gestation demonstrate a dominant antiinflammatory immunological response. *Journal of Dairy Science*, 95: 117-126.
- Raddatz J., Elias A., Whisnant C. (2008). Measurements of Adiponectin in lactating dairy cows. *Journal of Animal Science*, 86 (E-Suppl 2): 60-69.
- Rainard P. and Riollot C. (2006). Innate immunity of the bovine mammary gland. *Veterinary Research*, 37: 369-400.
- Raphael W. and Sordillo L.M. (2013). Dietary polyunsaturated fatty acid and inflammation: The role of phospholipid biosynthesis. *International Journal of Molecular Science*, 14: 21167-21188.
- Reinhardt T.A., Lippolis J.D., McCluskey B.J., Goff J.P., Horst R.L. (2011). Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. *The Veterinary Journal*, 188: 122-124.
- Reist M., Erdin D., von Euw D., Tschuemperlin K., Leuenberger H., Delavaud C., Chilliard Y., Hammon H.M., Kuenzi N., Blum J.W. (2003). Concentrate Feeding Strategy in Lactating Dairy Cows: Metabolic and Endocrine Changes with Emphasis on Leptin. *Journal of Dairy Science*, 86: 1690-1706.
- Rémond B., Cisse M., Ollier A., Chilliard Y. (1991). Slow release somatotropin in dairy heifers and cows fed two levels of energy concentrate. *Journal of Dairy Science*, 74: 1370-1381.
- Rhoads M., Rhoads R., VanBaale M., Collier R., Sanders S., Weber W., Crooker B., Baumgard L. (2009). Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows: I. Production, metabolism, and aspects of circulation somatotropin. *Journal of Dairy Science*, 92: 1986-1997.
- Rinaldi M., Moroni P., Paape M.J., Bannerman D.D. (2007). Evaluation of assays for the measurement of bovine neutrophil reactive oxygen species. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 115: 107-125.
- Riollot C., Rainard P., Poutrel B. (2000). Kinetics of cells and cytokines during immune-mediated inflammation in the mammary gland of cows systemically immunized with *Staphylococcus aureus* a-toxin. *Inflammation Research*, 49: 486-496.
- Roche J.R. and Berry D.P. (2006). Periparturient climatic, animal, and management factors influencing incidence of milk fever in grazing dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89: 2775-2783.

- Roche J.R., Friggens N.C., Kay J.K., Fisher M.W., Stafford K.J., Berry D.P. (2009). Invited review: Body condition score and its association with dairy cows productivity, health, and welfare. *Journal of Dairy Science*, 92: 5769-5801.
- Roche J.R., Meier A., Heiser A., Mitchell M.D., Walker C.G., Crookenden M.A., Vailati Riboni M., Loor J.J., Kay J.K. (2015). Effects of precalving body condition score and prepartum feeding level on production, reproduction, and health parameters in pasture-based transition dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 98: 7164-7182.
- Rontved C.M., Andersen J.B., Dernfalk J., Ingvartsen K.L. (2005). Effects of diet energy density and milking frequency in early lactation on tumor necrosis factor- $\alpha$  responsiveness in dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 104: 171-181.
- Ruegg P. (2017). A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *Journal of Dairy Science*, 100: 10381-10397.
- Ruprechter G., Adrien M.L., Larriestra A., Meotti O., Batista C., Meikle A., Noro M. (2018). Metabolic predictors of peri-partum diseases and their association with parity in dairy cows. *Research in Veterinary Science*, 118: 191-198.
- Sander A.K., Piechotta M., Schlamberger G., Bollwein H., Kaske M., Sipka A., Schuberth H.J. (2011). Ex vivo phagocytic overall performance of neutrophilic granulocytes and the relation to plasma insulin-like growth factor-I concentrations in dairy cows during the transition period. *Journal of Dairy Science*, 94: 1762-1771.
- Sartorelli P., Paltrinieri S., Comazzi S. (2000). Non-specific immunity and ketone bodies. In vitro studies on adherence and superoxide anion production in ovine neutrophils. *Journal of Veterinary Medicine. A, physiology, pathology and Clinical Medical*, 47: 1-8.
- SAS Institute Inc. (2018). SAS® University Edition, Cary, North Carolina, USA.
- Sato S., Suzuki T., Okada K. (1995a). Suppression of mitogenic response of bovine peripheral blood lymphocytes by ketone bodies. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 57: 183-185.
- Sato S., Suzuki T., Okada K. (1995b). Suppression of lymphocyte blastogenesis in cows with puerperal metritis and mastitis. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 57: 373-375.
- Scalia D., Lacetera N., Bernabucci U., Demeyere K., Duchateau L., Burvenich C. (2006). In vitro effects of non-esterified fatty acids on bovine neutrophils oxidative burst and viability. *Journal of Dairy Science*, 89: 147-154.
- Schukken Y.H., Gunther J., Fitzpatrick J., Fontaine M.C., Goetze L., Holst O., Leigh J., Petzl W., Schuberth H.J., Sipka A., Smith P.G.E., Quesnell R., Watts J., Yancey R., Zerbe H., Gurjar H., Zadoks R.N., Seyfert H.M., members of the Pfizer mastitis research consortium. (2011). Host-response patterns of intramammary infections in dairy cow. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 144: 270-289.
- Sepúlveda P., Weary D., Noro M., von Keyserlingk M. (2015). Transition diseases in grazing dairy cows are related to serum cholesterol and other analytes. *PLOS ONE*, DOI: 0122317.
- Shafer-Weaver K.A., Corl C.M., Sordillo L.M. (1999). Shifts in Bovine CD4<sup>+</sup> Subpopulations Increase T-helper-2 Compared with T-helper-1 Effectors Cells during the Postpartum Period. *Journal of Dairy Science*, 82: 1696-1706.

- Sheldon I.M., Molinari P.C.C., Ormsby T.J.R., Bromfield J.J. (2020). Preventing postpartum uterine disease in dairy cattle depends on avoiding, tolerating and resisting pathogenic bacteria. *Theriogenology*, 150: 158-165.
- Shuster D. E., Lee E.K., Kehrli M.E. Jr. (1996). Bacterial growth, inflammatory cytokine production, and neutrophil recruitment during coliform mastitis in cows within ten days after calving, compared with cows at mid lactation. *American Journal of Veterinary Research*, 57: 1569-1575.
- Singh S.P., Haussler S., Gross J.J., Schwarz F.J., Bruckmaier R.M., Sauerwein H. (2014). Short communication: circulating and milk adiponectin change differently during energy deficiency at different stage of lactation in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 97: 1535-1542.
- Sipka A., Gurjar A., Klaessig S., Duhamel G.E., Skidmore A., Swinkels J., Cox P., Schukken Y.H. (2013). Prednisolone and cefapirin act synergistically in resolving experimental *Escherichia coli* mastitis. *Journal of Dairy Science*, 96: 4406-4418.
- Sordillo L.M., Pighetti G.M., Davis M.R. (1995). Enhanced production of bovine tumor necrosis factor- $\alpha$  during the periparturient period. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 49: 263-270.
- Sordillo L.M. and Streicher K.L. (2002). Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Journal of Mammary Gland Biology Neoplasia*, 7: 135-146.
- Sordillo L.M. and Aitken S.L. (2009). Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128: 104-109.
- Sordillo L.M. (2016). Nutritional strategies to optimize dairy cattle immunity. *Journal of Dairy Science*, 99: 4967-4982.
- Sordillo L.M. (2018). Symposium review: Oxylipids and the regulation of bovine mammary inflammatory responses. *Journal of Dairy Science*, 101: 5629-5641.
- Spears J.W. and Weiss W.P. (2008). Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. *Veterinary Journal*, 176: 70-76.
- Ster C., Loisselle M.C., Lacasse P. (2012). Effect of postcalving serum nonesterified fatty acids concentration on the functionality of bovine immune cells. *Journal of Dairy Science*, 95: 708-717.
- Summers C., Rankin S.M., Condliffe A.M., Singh N., Peters A.M., Chilvers E.R. (2010). Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in Immunology*, 31: 318-324.
- Suriyasathaporn W., Daemen A.J.J.M., Noordhuizen-Stassen E.N., Dieleman S.J., Nielen M., Schukken Y.H. (1999).  $\beta$ -Hydroxybutyrate levels in peripheral blood and ketone bodies supplemented in culture media affect the in vitro chemotaxis of bovine leukocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 68: 177-186.
- Suriyasathaporn W., Heuer C., Noordhuizen-Stassen E.N., Schukken Y. (2000). Hiperketonemia and the impairment of udder defense: a review. *Veterinary Research*, 31: 397-412.
- Tamminga S., Luteijn P.A., Meijer R.G.M. (1997). Changes in composition and energy content of liveweight loss in dairy cows with time after parturition. *Livestock Production Science*, 5: 231-239.
- Targowski S.P. and Klucinski W. (1983). Reduction in mitogenic response of bovine lymphocytes by ketone bodies. *American Journal of Veterinary Research*, 44: 828-830.

- Taylor V.J., Cheng Z., Pushpakumara P.G.A., Beever D.E., Wathes D.C. (2004). Relationships between the plasma concentrations of insulin-like growth factor-I in dairy cows and their fertility and milk yield. *Veterinary Record*, 155: 583-588.
- Tornquist S.J. and Rigas J. (2010). Interpretation of ruminant leukocyte responses. D.J. Weiss, K.J. Wardrop (Eds.), *Schalms Veterinary Hematology*, Wiley Blackwell, Ames, IA, pp. 307-313.
- Trevisi E. and Bertoni G. (2010). Some physiological and biochemical methods for acute and chronic stress evaluation in dairy cows. *Journal Animal Science*, 8: 265-286.
- Trevisi E., Amadori M., Cogrossi S., Razzuoli E., Bertoni G. (2012). Metabolic stress and inflammatory response in high-yielding, periparturient dairy cows. *Research in Veterinary Science*, 93: 695-704.
- Trevisi E., Jahan N., Bertoni G., Ferrari A., Minuti A. (2015). Pro-inflammatory cytokine profile in Dairy cows: consequences for new lactation. *Italian Journal of Animal Science*, 14: 285-292.
- Vangroenweghe F., Lamote I., Burvenich C. (2005). Physiology of the periparturient period and its relation to severity of clinical mastitis. *Domestic Animal Endocrinology*, 29: 283-293.
- Wathes D., Cheng Z., Bourne N., Taylor V., Coffey M., Brotherstone S. (2007). Differences between primiparous and multiparous dairy cows in the inter-relationships between metabolic traits, milk yield and body condition score in the periparturient period. *Domestic Animal Endocrinology*, 33: 203-225.
- Wathes D.C., Cheng Z., Chowdhury W., Fenwick M.A., Fitzpatrick R., Morris D.G., Patton J., Murphy J.J. (2009). Negative energy balance alters global gene expression and immune response in the uterus of postpartum dairy cows. *Physiological Genomics*, 39: 1-13.
- Weber C., Hametner C., Tuchscherer A., Losand B., Kanitz E., Otten W., Sauerwein H., Bruckmaier R.M., Becker F., Kanitz W., Hammon H.M. (2013). Hepatic gene expression involved in glucose and lipid metabolism in transition cows: Effects of fat mobilization during early lactation in relation to milk performance and metabolic changes. *Journal of Dairy Science*, 96: 5670-5681.
- Weber C., Schäff C.T., Kautzsch U., Börner S., Erdmann S., Görs S., Röntgen M., Sauerwein H., Bruckmaier R.M., Metges C.C., Kuhla B., Hammon H.M. (2016). Insulin-dependent glucose metabolism in dairy cows with variable fat mobilization around calving. *Journal of Dairy Science*, 99: 6665-6679
- Weber P.S., Madsen S.A., Smith G.W., Ireland J.J., Burton J.L. (2001). Pre-translational regulation of neutrophil L-selectin in glucocorticoid-challenged cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 83: 213-240.
- Weber P.S.D., Toelboell T., Chang L.C., Durrett Tirrell J., Saama P.M., Smith G.W., Burton J.L. (2004). Mechanisms of glucocorticoid-induced down-regulation of neutrophil L-selectin in cattle: evidence for effects at the gene-expression level and primarily on blood neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 75: 815-827.
- Werling D. and Jungi T. (2003). Toll-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 91: 1-12.
- Wilson D. J., Gonzalez R.N., Hertl J., Schulte H.F., Bennett G.J., Schukken Y.H., Grohn Y.T. (2004). Effect of clinical mastitis on the lactation curve: A mixed model estimation using daily milk weights. *Journal of Dairy Science*, 87: 2073-2084.
- Zenclussen A.C. (2013). Adaptive immune response during pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*, 69: 291-303.

Zhou H., Song X., Briggs M., Violand B., Salsgiver W., Gulve E.A., Luo Y. (2005).  
Adiponectin represses gluconeogenesis independent of insulin in hepatocytes.  
Biochemical and Biophysical Research Communications, 338: 7

## 11. ANEXO

### **Tumor necrosis factor- $\alpha$ response of peripheral blood mononuclear cells after *Escherichia coli* *in vitro* challenge is greater in early vs mid lactation grazing dairy cows**

Mauricio Bentancor<sup>1</sup>, Joaquín Barca<sup>1</sup>, Ynte Schukken<sup>2</sup> and Ana Meikle<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>2</sup>Wageningen University, Wageningen the Netherlands

#### **Abstract**

The objective of this study was to describe the effect of the lactation stage (early lactation vs mid lactation) on the functionality of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in terms of Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) response, in non-pregnant grazing dairy cows when *in vitro* challenged with *Escherichia coli*. Peripheral blood was collected at  $14 \pm 4$  days after calving (‘early lactation group’,  $n = 8$ ) and at  $123 \pm 31$  days after calving (‘mid lactation group’,  $n = 8$ ). The PBMC were co-cultured with the autologous serum or fetal bovine serum. The TNF- $\alpha$  response after *E. coli* challenge was greater and faster in early lactation than mid lactation cows when PBMC were co-cultured in autologous serum. In contrast, no differences were observed between lactation stage groups when cells were co-cultured with fetal bovine serum. These data suggest that the lactation stage and type of serum plays an important role in the response capacity of PBMC in terms of TNF- $\alpha$  level.

**Additional keywords:** Mammary immunity, Inflammation, PBMC, Maturation, Cytokines, TNF- $\alpha$ .

#### **Introduction**

Around the 50 % of dairy cows experience metabolic and/or infectious diseases in the transition period (LeBlanc, 2010). During this period increased energy requirements combined with the depression of dry matter intake (DMI), results in a state of negative energy balance (NEB) (Grummer, 1995; Drackley, 1999; Goff, 2006). The increase in hepatic gluconeogenesis, the decreased use of glucose by peripheral tissues (insulin resistance), and increased lipomobilization (increase in non-esterified fatty acids (NEFA)), are homeorhetic adaptations to increase the availability of energy substrates (Bell, 1995a). To cope with NEB, dairy cows have an outstanding ability to mobilize body reserves that are reflected in metabolic profiles (Herdt, 2000). However, metabolic changes are also reflected in peri-partum diseases and impaired immune responses (Drackley, 1999; Sordillo, 2016).

The constituent cells of the immune system involved in the innate and adaptive response are altered during the transition period (Burvenich et al., 2003). The amount and speed of tissue mobilization has been related to immunosuppression (Ingvartsen and Moyes, 2015), and this immunosuppression is a risk of the increased susceptibility to develop diseases (Burton et al., 2001; Ingvartsen et al., 2003). The NEB with greater concentrations of both NEFA and beta-hydroxybutyrate (BHB) has been associated with lower neutrophil blood counts and a decrease in the ability to phagocytosis and kill



bacteria (Hammon et al., 2006). Reduced neutrophil functional capabilities during this time were associated with early lactation health disorders including uterine disorders and mastitis (Cai et al., 1994; Kimura et al., 2002).

The metabolic stress during the postpartum period in dairy cattle has been associated with the inflammation (Esposito et al., 2014), and it increases risk of clinical mastitis (McDougall et al., 2009; De Vliegher et al., 2012). The inflammation is a critical component of the innate defense system that involves complex biological responses of both cellular and soluble factors following local tissue injury (Sordillo, 2016). The initiation of the inflammation cascade result in increased production of Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Van Miert, 1991). TNF- $\alpha$  is an important pro-inflammatory cytokine, mediator of inflammation both at the local and at the systemic level (Schukken et al., 2011). Sordillo et al. (1995) related the greater production of TNF- $\alpha$  in the postpartum with greater observed severity of coliform mastitis (endotoxemia) in the same period. Pomeroy et al. (2015) have developed *in vitro* methodologies for the study of the functionality of the cells of the immune system. This authors evaluated the functionality of dendritic cells stimulated by *Escherichia coli*, isolated from clinical cases of clinical mastitis (Dogan et al., 2006) and used for intra-mammary challenges (Quesnell et al., 2012; Gurjar et al., 2013; Sipka et al., 2013). In these *in vitro* studies, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of cows at different moments of gestation / lactation cycle are co-cultured with the specific serum of these animals.

The functional capacity of PBMC, in terms TNF- $\alpha$  response to an *E. coli* challenge, in healthy grazing dairy cows according to stage of lactation, as far as we know is not known. Therefore, we hypothesized that the TNF- $\alpha$  production of PBMC when stimulated with *E. coli in vitro* is higher in early than mid lactation grazing dairy cows and this response is affected by the cell environment. The aim of the present study was to describe TNF- $\alpha$  production curve of mononuclear's cells from early lactation compared with mid lactation in non-pregnant grazing dairy cows when *in vitro* stimulated with UV irradiated *E. coli* ECC-Z. Furthermore, to investigate the relevance of type of serum on TNF- $\alpha$  response, cells were co-cultured with fetal bovine serum.

## Materials and methods

### *Animals*

Sixteen Holstein-Friesian non-pregnant and multiparous cows were selected from a commercial dairy herd in San Jose, Uruguay (34°S-57°W). No diseases (*i.e.* metabolic, reproductive, mastitis) were recorded since 30 days prior to the calving and the time of sampling. Diseases was monitored daily and recorded in DairyComp® Herd Management Software (Valley Agricultural Software, Tulare, CA, USA). Cows presented an approximate milk yield of 8300-8700 kg per lactation. From day -30 until calving, cows were kept on paddock with low supply of grass (< 10 kg DMI/cow/day) and were fed also a total mixed ration (TMR) according to close-up requirements (NRC 2001) twice a day at 8:00 and 16:30 hs and anionic salts. After calving, all cows were fed with a mix of 70% pasture and 30% TMR, according to fresh cow's requirements (NRC, 2001) and milked 2 times daily.

Peripheral blood and serum was collected by coxigeal venipuncture at 8 cows at  $14 \pm 4$  (mean  $\pm$  SEM) days after calving, to be called 'early lactation group' and 8 cows at  $123 \pm 31$  days after calving, to be called 'mid lactation group'. Blood samples were taken

with vacuum containing EDTA and vacutainer glass serum tubes with no additive (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). The samples were put on ice and transported immediately to the laboratory and were processed in the Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal and Laboratorio de Inmunología, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay. The use and care of all animals were approved by the Comisión Honoraria de Experimentación Animal, Universidad de la República (project number: 598/2017).

#### *Mononuclear's cell isolation*

Peripheral blood mononuclear cells were isolated from whole and fresh blood diluted 1:1 ratio in sterile PBS (Life Technology, Grand Island, NY, USA) by density gradient centrifugation (400-450 g, 30 min, 18-20°C) with Lymphocytes Separation Medium (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Germany). The PBMC were isolated from the interphase and pooled. Any remaining red blood cells were lysed with hypotonic NaCl solution and washed once more in PBS following erythrolysis. Mononuclear's cells were counted and determined viability by trypan-blue dye exclusion and resuspended in differentiation media (phenol-free complete RPMI with L-glutamine supplement, Life Technology, Grand Island, NY). Then they were plated in 48-well tissue culture plates at  $6.0 \times 10^5$  cells in 750  $\mu$ l RPMI per well. The same cells were cultured with 10% autologous serum or inactivated fetal bovine serum (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Germany) and leave it for acclimatization for 24 hs (37°C, 5%CO<sub>2</sub>).

#### *Maturation of PBMC with UV irradiated E. coli*

After acclimatization the cells were counted and were induced by bacterial stimulation through the addition of UV irradiated *E. coli* ECC-Z in an MOI (Multiplicity of Infection) of 10 (Dogan et al., 2006; Cavatorta et al., 2009). Incubation times were as follows: 0, 0.5, 1, 2, 4, 8 and 24 hs, and cultures without bacterial stimulation were considered negative controls. Cells culture supernatant was collected and stored at -80°C until later TNF- $\alpha$  analysis by ELISA.

#### *Measurement of TNF- $\alpha$ by ELISA kit*

The concentrations of TNF- $\alpha$  in culture supernatant were assayed with an ELISA (Thermo Fisher, Vantaa, Finland) validated for use in cattle. The procedures were performed according to the guidelines provided by the manufactures. Absorbance readings were performed on an automatic microtiter plate reader (Multiskan EX, Thermo Fischer Scientific, Vantaa, Finland) at 450-560 nm filters. All standards and samples were assayed in duplicate. The result was calculated whit a standards curve. The inter- and intra-assay coefficients of variation for TNF- $\alpha$  were < 12 and < 10%, respectively.

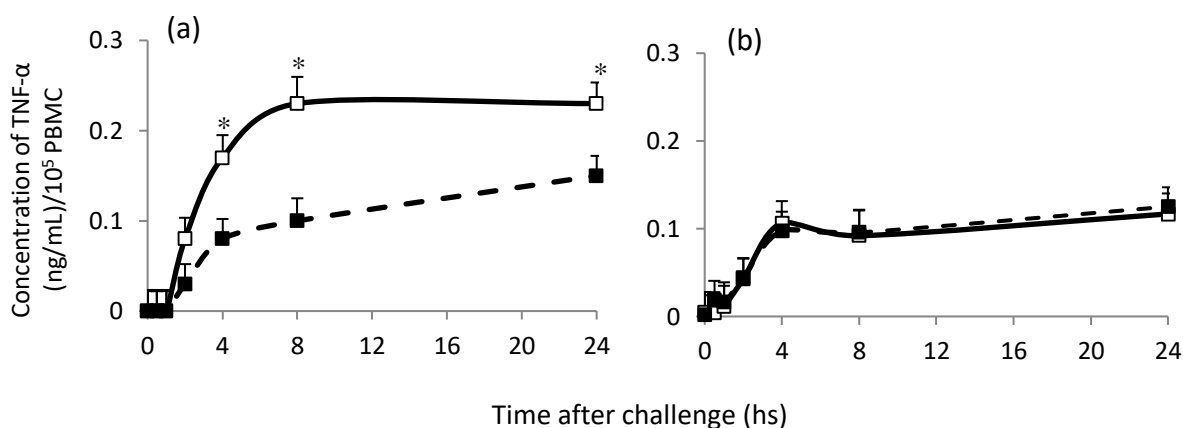
#### *Statistical analysis*

Data were analyzed using SAS statistical analysis system program (2001), version 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). All values were expressed as the mean  $\pm$  standard error. TNF- $\alpha$  concentrations in culture supernatants were analyzed using Proc Mixed, including in the statistical model the group (early vs mid lactation), serum (autologous serum vs fetal bovine serum), time (0, 0.5, 1, 2, 4, 8 and 24 hs) and their interactions. Statistical differences were analyzed by Tukey-Kramer tests. Differences with  $P \leq 0.05$  were considered significant and  $0.05 < P \leq 0.10$  were considered a tendency.

## Results

Stimulation of cells resulted in significant increase in TNF- $\alpha$  level compared to the negative controls (data not shown), and lactation group, serum and time after challenge dependent. A comparison of TNF- $\alpha$  production with respect stage of lactation (early vs mid lactation), serum (autologous vs fetal bovine serum), time of stimulation (0, 0.5, 1, 2, 4, 8 and 24 hs) and their interactions are summarized in Fig. 1.

After four hours post challenge, cells isolated from early lactation group produced significantly ( $P < 0.01$ ) higher and faster levels of TNF- $\alpha$  when compared to mid lactation group, when cells were co-cultured in autologous serum (Fig. 1a). In contrast, in the present study no significant production were observed between lactation stage groups when cells were co-cultured with fetal bovine serum (Fig. 1b), and also the response was lower than when co-incubated with the autologous serum (data not shown).



**Fig. 1.** TNF- $\alpha$  concentration (ng/mL)/10<sup>5</sup> PBMC after (hs) stimulation with UV irradiated *E. coli* ECC-Z in PBMC cultures in autologous serum (a) and fetal bovine serum (b) as determined by ELISA kit. Solid black lines represent early lactation group and dotted back lines mid lactation group and all points represent mean (n= 8) with error bars symbolize standard error. Significant differences were determined by repeated measures Tukey-Kramer tests indicated by asterisk (\*)  $P \leq 0.05$ .

## Discussion

In this study, describes the effect of the lactation stage (early lactation vs mid lactation) on the functionality of PBMC in terms of TNF- $\alpha$  response, in non-pregnant grazing dairy cows when *in vitro* challenged with *E. coli*. The preliminary results of this study are novel, since TNF- $\alpha$  production curves were generated after challenge of PBMC with *E. coli*.

Mononuclear's cells isolated from early lactation dairy cows produced significantly more TNF- $\alpha$  than cells obtained from mid lactation animals, when cells were co-cultured in autologous serum. In addition, the increased production of TNF- $\alpha$  in early lactation follows the same *in vitro* TNF- $\alpha$  kinetics in this period (Sordillo et al., 1995; Rontved et al., 2005). The TNF- $\alpha$  response is affected by lactation cycle (Burvenich et

al., 2007), and the higher response during the postpartum period compared with mid lactation, after stimulation with *E. coli* or *E. coli* LPS, has been reported (Sordillo et al., 1995; Rontved et al., 2005; Khatun et al., 2017). The increase TNF- $\alpha$  level in early lactation group could be explained by stage of lactation and metabolic stress in that period. During this period increased energy requirements and combined with the depression of DMI result in a state of NEB. To cope with NEB, dairy cows have an outstanding ability to mobilize body reserves that are reflected in metabolic profiles. Altered lipid metabolism, increased circulating concentrations of NEFA and oxidative stress has been directly linked to a more exacerbated inflammatory response (Esposito et al., 2014). It has been shown that late pregnant dairy cows, once challenged, respond with a Th2 or anti-inflammatory immune response that turns to a Th1 or pro-inflammatory response after calving (Shafer-Weaver et al., 1999; Schukken et al., 2011; Pomeroy et al., 2015). Moreover, the gene expression of inflammatory genes is increased in cows with exacerbated negative energy status at the beginning of lactation (Wathes et al., 2009).

In contrast, in the present study no significant TNF- $\alpha$  production were observed between lactation stage groups when cells were co-cultured with fetal bovine serum. This result is very interesting and these data suggest that the environment (metabolic/endocrine), in which cells were co-culture, plays an important role in the response capacity of PBMC in terms of TNF- $\alpha$  level.

To our knowledge this was the first study to investigate the functional capacity of PBMC, in terms TNF- $\alpha$  response to *in vitro* challenge of *E. coli*, in healthy grazing dairy cows according to stage of lactation. The production of TNF- $\alpha$  during the periparturient period may be one means of reducing the impact of mastitis on dairy herds. Precise mechanism involved in the TNF- $\alpha$  production in early lactation requires further investigation.

## **Conclusions**

In summary, the TNF- $\alpha$  response after *E. coli* challenge was greater and faster in early lactation than mid lactation group when PBMC were co-cultured in autologous serum. Our study also reconfirmed the previous observation that the production of TNF- $\alpha$  is affected by the lactation period. In contrast, no differences were observed between lactation stage groups when cells were co-cultured with fetal bovine serum, suggesting that the type of serum plays an important role in the response capacity of PBMC cells in terms of TNF- $\alpha$  level.

## **Conflict of interests**

The authors declare no conflicts of interests.

## **Acknowledgements**

We would like to acknowledgements the Laboratorio de Inmunología, Facultad de Veterinaria, Montevideo, for their assistance and provision of their facilities for the isolation and maturation of PBMC whit UV irradiated *E. coli*.

## References

- Bell A.W. (1995). Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of Animal Science*, 73: 2804-2819.
- Burton J.L., Madsen S.A., Yao J., Sipkovsky S.S., Coussens P.M. (2001). An immunogenomics approach to understanding periparturient immunosuppression and mastitis susceptibility in dairy cows. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 42: 407-424.
- Burvenich C., Van Merris V., Mehrzad J., Diez-Fraile A., Duchateau L. (2003). Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factor. *Veterinary Research*, 34: 521-564.
- Burvenich C., Bannerman D.D., Lippolis J.D., Peelman L., Nonnecke B.J., Kehrli Je M.E., Paape M.J. (2007). Cumulative physiological events influence the inflammatory response of the bovine udder to *Escherichia coli* infections during the transition period. *Journal of Dairy Science*, 90: 39-54.
- Cai T.Q., Weston P.G., Lund L.A., Brodie B., McKenna D.J., Wagner W.C. (1994). Association between neutrophil functions and periparturient disorders in cows. *American Journal of Veterinary Research*, 55: 934-943.
- Cavatorta D.J., Erb H.N., Flaminio M.J.B.F. (2009). Ex vivo generation of mature equine monocyte-derived dendritic cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 131 (3): 259-267.
- De Vlieghe S., Fox L.K., Piepers S., Mc Dougall S., Barkema H.W. (2012). Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the diseases, potential impact, prevention and control. *Journal of Dairy Science*, 95: 1025-1040.
- Dogan B., Klaessig S., Rishniw M., Almeida R.A., Oliver S.P., Simpson K., Schukken Y.H. (2006). Adherent and invasive *Escherichia coli* are associated with persistent bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 116: 270-282.
- Drackley J.K. (1999). Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? *Journal of Dairy Science*, 82: 2259-2273.
- Esposito G., Irons P.C., Webb E.C., Chapwanya A. (2014). Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 144: 60-71.
- Goff J.P. (2006). Major advances in our understanding of nutritional influences on bovine health. *Journal of Dairy Science*, 89: 1292-1301.
- Grummer R.R. (1995). Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *Journal of Animal Science*, 73: 2820-2833.
- Gurjar A.A., Klaessig S., Salmon S.A., Yancey J., Robert J., Schukken Y.H. (2013). Evaluation of an alternative dosing regimen of a J-5 mastitis vaccine against intramammary *Escherichia coli* challenge in nonlactating late-gestation dairy cow. *Journal of Dairy Science*, 96: 5053-5062.
- Hammon D.S., Evjen I.M., Dhiman T.R., Goff J.P., Walters J.L. (2006). Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 113: 21-29.
- Herd T.H. (2000). Ruminant adaptation to negative energy balance. *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 16: 215-230.
- Ingvarsen K.L., Dewhurst R.J., Friggens N.C. (2003). On the relationship between lactational performance and health: Is it yield or metabolic imbalance that cause production diseases in dairy cattle? A position paper. *Livestock Production Science*, 83: 277-308.

- Ingvarstsen K.L., Moyes K.M. (2015). Factors contributing to immunosuppression in the dairy cow during the periparturient period. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 63: (Supplement 1), 15-24.
- Kimura K., Goff J.P., Kehrl M.E. Jr, Reinhardt T.A. (2002). Decreased neutrophil function as a cause of retained placenta in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 85: 544–550.
- Khatun M., Jorgensen H.B.H., Ehsani A., Lund M.S., Sahana G., Sorensen P., Rontved C.M. (2017). Whole blood optimization and genetic association of ex vivo TNF- $\alpha$  responsiveness to killed E. coli in Danish Holstein cows. *Livestock Science*, 201: 92-98.
- LeBlanc S. (2010). Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *Journal of Reproduction and Development*, 56: 29–35.
- McDougall S., Parker K.I., Heuer C., Compton C.W.R. (2009). A review of prevention and control of heifers mastitis via non-antibiotic strategies. *Veterinary Microbiology*, 134: 177-185.
- NRC (2001). 'Nutrient requirements of dairy cattle.' 7th rev. edn. (National Academy Press: Washington, DC)
- Pomeroy B., Sipka A., Klaessig S., Schukken Y.H. (2015). Monocyte-derived dendritic cells from late gestation cows have an impaired ability to mature in response to E. coli stimulation in a receptor and cytokine-mediated fashion. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 167: 22–29.
- Quesnell R.R., Klaessig S., Watts J.L., Schukken Y.H. (2012). Bovine intramammary Escherichia coli challenge infections in late gestation demonstrate a dominant antiinflammatory immunological response. *Journal of Dairy Science*, 95: 117–126.
- Rontved C.M., Andersen J.B., Dernfalk J., Ingvarstsen K.L. (2005). Effects of diet energy density and milking frequency in early lactation on tumor necrosis factor-alpha responsiveness in dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 104: 171-181.
- SAS Institute (2001). Users Guide: Statistics. 9.2th ed. SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA.
- Shafer-Weaver K.A., Corl C.M., Sordillo L.M. (1999). Shifts in Bovine CD4<sup>+</sup> Subpopulations Increase T-helper-2 Compared with T-helper-1 Effector Cells During the Postpartum Period. *Journal of Dairy Science*, 82: 1696-1706.
- Schukken Y.H., Gunther J., Fitzpatrick J., Fontaine M.C., Goetze L., Holst O., Leigh J., Petzl W., Schuberth H.J., Sipka A., Smith P.G.E., Quesnell R., Watts J., Yancey R., Zerbe H., Gurjar H., Zadoks R.N., Seyfert H.M., members of the Pfizer mastitis research consortium (2011). Host-response patterns of intramammary infections in dairy cow. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 144: 270-289.
- Sipka A., Gurjar A., Klaessig S., Duhamel G.E., Skidmore A., Swinkels J., Cox P., Schukken Y.H. (2013). Prednisolone and cefapirin act synergistically in resolving experimental Escherichia coli mastitis. *Journal of Dairy Science*, 96: 4406-4418.
- Sordillo L.M., Pighetti G.M., Davis M.R. (1995). Enhanced production of bovine tumor necrosis factor- $\alpha$  during the periparturient period. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 49: 263-270.
- Sordillo L.M. (2016). Nutritional strategies to optimize dairy cattle immunity. *Journal of Dairy Science*, 99: 4967-4982.
- Van Miert A.S.J.P.A.M. (1991). Acute phase response and non cellular defense mechanism. *Flemish Veterinary Journal*, 62: 69-91.

Wathes D.C., Cheng Z., Chowdhury W., Fenwick M.A., Fitzpatrick R., Morris D.G., Patton J., Murphy J.J. (2009). Negative energy balance alters global gene expression and immune response in the uterus of postpartum dairy cows. *Physiological Genomics*, 39: 1-13.