



**Universidad Nacional del Litoral**  
*Facultad de Ciencias Veterinarias*

*Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral), (UNL-CONICET)*  
*Facultad de Ciencias Veterinarias – Universidad Nacional del Litoral*

*Tesis presentada para optar por el grado académico de*  
*Doctor en Ciencias Veterinarias*

***“Relación entre el metabolismo hepático y la reproducción en vacas lecheras de alta producción durante el Período de Transición”***

**Autor: M.V. Emmanuel Angeli.**

**Director: Dr. Hugo Héctor Ortega.**

**Codirector: Dr. Gustavo Juan Hein.**

**2020**

*A mis viejos, Ana y Héctor....*

*“No el mucho saber harta y satisface el alma,  
sino el sentir y gustar de las cosas internamente”  
(EE.EE. [2]).*

*San Ignacio de Loyola*

## **Agradecimientos...**

- *A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) por los subsidios necesarios para el desarrollo de este trabajo de Tesis.*
- *Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la beca que me permitió realizar los estudios de posgrado en la carrera de Doctorado en Ciencias Veterinarias.*
- *A la Facultad, que me dio la posibilidad de ser de Médico Veterinario hace unos años, hoy de doctorarme; pero sobre todo que me brindó la posibilidad de conocer amistades que perdurarán en el tiempo.*
- *A Hugo por la posibilidad de realizar este doctorado, así como la claridad de su guía durante el mismo.*
- *A Gustavo, por la exigencia, la compañía, pero sobre todo por la confianza.*
- *A Flor y Nati, por la ayuda cada vez que las necesitamos.*
- *A todos y cada uno de mis compañeros del LBCMA y del CMC, por la ayuda brindada en el doctorado, pero sobre todo por hacerme disfrutar de cada día de trabajo.*
- *Al Bocha Quercia y a todo el personal de La Cabañita por la ayuda (y la paciencia) durante el muestreo de esta tesis y los demás muestreos realizados en el establecimiento.*
- *A Marcelo Signorini, por la ayuda ante cada consulta estadística.*
- *A José Bértoli y Emanuel Gatti por la ayuda en el área de nutrición.*
- *A mis compañeros de Practica Hospitalaria de Grandes Animales, por el tiempo que tuvieron que cubrirme.*
- *A mis familiares, amigos y muchas personas con los que he tenido la dicha de compartir distintos momentos de mi vida, uno es su historia.*
- *A mis abuelos, por el cariño y la inspiración que me han dado.*
- *A mis hermanos, por la sonrisa que me sacan todos los días.*
- *A mis papas, por las exigencias de cuando era chico y por el apoyo de cuando fui más grande.*
- *A Mili por la compañía incondicional, no sería lo mismo sin vos.*
- *A Rosario y a Inés por mostrarme que esta tesis no es tan importante.*

# INDICE

---

Abreviaturas utilizadas .....	I
Índice de tablas .....	III
Índice de figuras .....	IV
Resumen .....	VI
Abstract.....	VII
CAPITULO I. Revisión bibliográfica y consideraciones generales.....	1
I. 1. INTRODUCCION .....	2
I. 1. 1. Adaptaciones fisiológicas de la vaca en transición .....	3
I. 1. 1. 1. Adaptaciones ruminales .....	3
I. 1. 1. 2. Adaptaciones endocrinas.....	6
I. 1. 2. Balance Energetico durante el periodo de transición.....	8
I. 1. 2. 1. Consumo en la vaca lechera peripartal.....	9
I. 1. 2. 2. Condición corporal, movilización grasa y funcionalidad hepática. ....	11
I. 2. OBJETIVOS .....	13
I. 2. 1. Objetivo general .....	13
I. 2.2. Objetivos específicos.....	13
CAPÍTULO II. Estudio I: Expresión génica y proteica de moléculas relacionados al metabolismo de los lípidos hepáticos en vacas lecheras en pastoreo durante el período de transición .....	14
II. 1. INTRODUCCIÓN .....	15
II. 1. 1. Movilización de AGNE .....	15
II. 1. 2. Oxidación de ácidos grasos.....	16
II. 1. 3. Cetogénesis .....	18
II. 1. 4. Síntesis de triglicéridos .....	20
II. 1. 5. Secreción hepática de lipoproteínas.....	20
II. 1. 6. Regulación del metabolismo lipídico.....	21
II. 1. 7. Metabolismo de ácidos grasos y otros lípidos durante el periodo de transición..	23
II. 2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	25
II. 2. 1. Procedimientos generales efectuados con animales .....	25
II. 2. 2. Animales .....	25
II. 2. 3. Alimentación.....	25

II. 2. 4. Toma de muestras .....	26
II. 2. 4. 1. Obtención de plasma.....	26
II. 2. 4. 2. Extracción de biopsias hepáticas .....	26
II. 2. 5. Procesamiento de muestras .....	26
II. 2. 5. 1. Determinación de metabolitos plasmáticos y mediciones hormonales.....	27
II. 2. 5. 2. Análisis del contenido de TG hepáticos.....	27
II. 2. 5. 3. Procesamiento de las muestras para el análisis mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) .....	28
II. 2. 5. 3. 1. Extracción de ARN total.....	28
II. 2. 5. 3. 2. Transcripción reversa.....	28
II. 2. 5. 3. 3. Diseño de cebadores específicos.....	29
II. 2. 5. 3. 4. Amplificación mediante RT-PCR.....	29
II. 2. 5. 4. Evaluación de la expresión proteica .....	31
II. 2. 5. 4. 1. Homogeneizado de las muestras .....	31
II. 2. 5. 4. 2. Análisis mediante Western blot .....	31
II. 2. 6. Análisis estadístico.....	33
II. 3. RESULTADOS .....	34
II. 3. 1. Condición corporal, parámetros metabólicos plasmáticos y contenido de triglicéridos en el hígado .....	34
II. 3. 2. Expresión génica de CPT1A, ACOX1 y DGAT1 .....	36
II. 3. 3. Expresión proteica de CPT1, ACOX1, PPAR $\alpha$ y DGAT1 .....	38
II. 4. DISCUSIÓN .....	39
CAPÍTULO III. Estudio II: Asociación entre el metabolismo de los ácidos grasos en el hígado y el rendimiento reproductivo.....	43
III. 1. Introducción.....	44
III. 1. 1. Reinicio de la actividad ovárica.....	44
III. 1. 2. Factores que afectan el reinicio de la actividad ovárica .....	46
III. 1. 3. Relación entre la repartición de energía y la reproducción .....	47
III. 2. Materiales y métodos.....	50
III. 2. 1. Procedimientos generales efectuados con animales .....	50
III. 2. 2. Alimentación .....	50
III. 2. 3. Muestras de sangre, líquido folicular e hígado.....	51
III. 2. 4. Determinación de concentraciones de metabolitos y hormonas en plasma y LF .....	51

III. 2. 5. Análisis estadístico .....	52
III. 3. RESULTADOS .....	53
III. 3. 1. Producción de leche, CC, parámetros plasmáticos y contenido de TG hepáticos .....	53
III. 3. 2. Expresión proteica de enzimas y receptor nuclear .....	55
III. 3. 3. Parámetros evaluados en líquido folicular.....	57
III. 4. Discusión .....	58
CAPITULO IV. Estudio III: Efecto de la condición corporal preparto sobre la señal de insulina y el estado inflamatorio hepático.....	64
IV. 1. Introducción .....	65
IV. 1. 1. Insulina: conceptos generales.....	65
IV. 1. 2. Vías de señalización de la insulina.....	66
IV. 1. 3. Insulina en rumiantes y medicina comparada .....	68
IV. 1. 4. TNF $\alpha$ , IL-6 y NF- $\kappa$ B .....	70
IV. 2. Materiales y métodos .....	74
IV. 2. 1. Animales y toma de muestras.....	74
IV. 2. 2. Separación de proteínas nucleares y citoplasmáticas .....	74
IV. 2. 3. Determinación de las concentraciones sistémicas de metabolitos y hormonas, contenido hepático de TG y evaluación de la expresión proteica en hígado de vacas .....	75
IV. 2. 5. Análisis estadístico .....	76
IV. 3. RESULTADOS .....	78
IV. 3. 1. Producción de leche, parámetros plasmáticos y contenido de TG hepáticos .....	78
IV. 3. 2. Expresión proteica de IR, IRS1, PI3K, Akt y pAkt; TNF $\alpha$ , IL-6 y NF- $\kappa$ B en hígado .....	80
IV. 4. Discusión .....	83
CAPÍTULO V. Discusión y Conclusiones finales. ....	88
Bibliografía.....	92

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

---

<b>ACC</b>	Alta Condición Corporal
<b>Acil-CoA</b>	Acil-CoA-tioésteres
<b>ACOX1</b>	Acil-CoA oxidasa 1
<b>ACSL</b>	Acil-CoA sintasa hepática
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico copia
<b>AGV</b>	Ácidos Grasos Volátiles
<b>Akt</b>	Proteína quinasa B
<b>Apo</b>	Apoproteína
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferasa
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>BCC</b>	Baja Condición Corporal
<b>BEN</b>	Balance Energético Negativo
<b>BHB</b>	Beta-hidroxibutirato
<b>BiD</b>	Bilirrubina Directa
<b>BiI</b>	Bilirrubina Indirecta
<b>BiT</b>	Bilirrubina Total
<b>CC</b>	Condición Corporal
<b>CMS</b>	Consumo de Materia Seca
<b>CNF</b>	Carbohidratos no fibrosos
<b>CPT1</b>	Carnitina palmitoil transferasa 1
<b>Ct</b>	Ciclo de umbral / Threshold point
<b>CV</b>	Coefficiente de variación
<b>DGAT</b>	Diacilglicerol-aciltransferasa
<b>ENL</b>	Energía neta de lactancia
<b>EPC</b>	Buffer para extracción de proteínas citoplasmática
<b>EPN</b>	Buffer para extracción de proteínas nuclear
<b>FA</b>	Fosfatasa Alcalina
<b>FABP</b>	Proteína de unión a ácidos grasos
<b>FAD</b>	Flavín adenín dinucleótido
<b>FATP</b>	Proteínas de transporte de ácidos grasos
<b>FDA</b>	Fibra detergente acida
<b>FDN</b>	Fibra Detergente Neutra
<b>FSH</b>	Hormona folículo estimulante
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
<b>GGT</b>	Gamma glutamil transpeptidasa
<b>GH</b>	Hormona de Crecimiento / Somatotrofina
<b>GHR</b>	Receptor de la Hormona de Crecimiento / Somatotrofina
<b>HDL</b>	Lipoproteínas de alta densidad

<b>HMG-CoAS</b>	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa
<b>HOT</b>	Teoría de la Oxidación Hepática
<b>IDL</b>	Lipoproteínas de densidad intermedia
<b>IGF1</b>	Factor de crecimiento similar a la insulina 1
<b>IκB</b>	Proteína inhibidora de κB
<b>IKK</b>	Quinasa del inhibidor de κB
<b>IL-6</b>	Interleuquina 6
<b>IPC</b>	Intervalo Parto-Concepción
<b>IR</b>	Receptor de insulina
<b>IRS</b>	Sustrato del receptor de insulina
<b>Jak</b>	Proteínas tirosina-quinasa Janus
<b>LDL</b>	Lipoproteínas de baja densidad
<b>LH</b>	Hormona Luteinizante
<b>MaIPC</b>	Mayor Intervalo Parto-Concepción
<b>MAPK</b>	Proteína quinasa activada por mitógeno
<b>MeIPC</b>	Menor Intervalo Parto-Concepción
<b>MS</b>	Materia Seca
<b>NF-κB</b>	Cadenas ligeras kappa de las células B activadas
<b>PC</b>	Proteína Cruda
<b>PCNA</b>	Antígeno nuclear de células en proliferación
<b>PDK1</b>	Quinasa dependiente de fosfoinositol 1
<b>PFA</b>	Proteína de fase aguda
<b>PFA-</b>	Proteína de fase aguda negativa
<b>PFA+</b>	Proteína de fase aguda positiva
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol-3-quinasa
<b>PIP2</b>	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
<b>PIP3</b>	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
<b>PPARα</b>	Receptor activador de la proliferación peroxisomal
<b>PT</b>	Periodo de Transición
<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.
<b>RXR</b>	Receptor retinoides X
<b>STAT</b>	Transductores de señales y activadores de la transcripción
<b>T</b>	Tiempo
<b>TCA</b>	Ácido tricarbóxico
<b>TG</b>	Triglicéridos
<b>TMR</b>	Dietas totalmente mezcladas
<b>TNFα</b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>UBQ</b>	Ubiquitina
<b>VLDL</b>	Lipoproteínas de muy baja densidad

## ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla 1.</b> Requerimiento energético pre y postparto de vacas Holstein calculados como energía neta de lactancia (ENL) (MJ/d).....	9
<b>Tabla 2.</b> Determinaciones plasmáticas y kits comerciales utilizados.....	27
<b>Tabla 3.</b> Secuencias de cebadores, regiones de los genes diana, y longitud del producto y de temperatura de hibridación, utilizadas para la RT-PCR semicuantitativa de tejidos bovinos..	30
<b>Tabla 4.</b> Anticuerpos y condiciones utilizados en la técnica de Western blot en el estudio I y II .....	33
<b>Tabla 5.</b> Concentraciones de insulina, proteína, albúmina, BilT, BilD, BilI y actividad de AST, GGT y FA en plasma a lo largo del periodo evaluado. ....	36
<b>Tabla 6.</b> Concentración de insulina, IGF1, proteína, albúmina, BilT y actividad de AST, GGT y ALP en plasma en animales agrupados como vacas con mayor intervalo parto-concepción (MaIPC) o menor intervalo parto-concepción (MeIPC). ....	55
<b>Tabla 7.</b> Anticuerpos y condiciones utilizados en la técnica de Western blot en el estudio III. ....	76
<b>Tabla 8.</b> CC, concentración plasmática de AGNE, BHB, glucosa, TG, insulina, IGF1 y contenido de TG hepático en animales agrupados como vacas con Alta Condición Corporal (ACC) o Baja Condición Corporal (BCC). ....	79

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b> Papilas ruminales antes y después de la adaptación ruminal preparto. ....	6
<b>Figura 2.</b> Concentraciones plasmáticas de GH, insulina e IGF1 desde los 21 días anteriores hasta los 28 días posteriores al parto.....	7
<b>Figura 3.</b> Teoría de oxidación hepática para el control de la ingesta. ....	11
<b>Figura 4.</b> Captación hepática de AGNE circulantes por medio de proteínas transportadoras.	16
<b>Figura 5.</b> Función de la carnitina en el transporte de ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana mitocondrial interna. ....	17
<b>Figura 6.</b> $\beta$ -oxidación mitocondrial de ácidos grasos. ....	18
<b>Figura 7.</b> Síntesis de cuerpos cetónicos.....	19
<b>Figura 8.</b> Metabolismo de las lipoproteínas del plasma.....	21
<b>Figura 9.</b> Activación transcripcional de PPAR.....	22
<b>Figura 10.</b> Diagrama de muestreos ensayo I. ....	26
<b>Figura 11.</b> Concentraciones plasmáticas de AGNE, BHB, TG y glucosa, y contenido hepático de TG durante el periodo evaluado. ....	35
<b>Figura 12.</b> Expresión relativa del ARNm ( $2^{\Delta\Delta Ct}$ ) de CPT1A, ACOX1 y DGAT1 en hígado durante el periodo evaluado.....	37
<b>Figura 13</b> Expresión proteica de CPT1, ACOX1, PPAR $\alpha$ y DGAT1 durante el periodo evaluado. ....	38
<b>Figura 14.</b> Esquema de la reanudación de la ciclicidad ovárica durante el período postparto en vacas de leche y de carne. ....	46
<b>Figura 15.</b> Representación esquemática del proceso multifactorial y posibles vías involucradas en las alteraciones ováricas postparto en vaca lechera.....	48
<b>Figura 16.</b> Diagrama de muestreos ensayo II y III.....	51
<b>Figura 17.</b> CC, concentraciones plasmáticas de AGNE, BHB, glucosa y TG y contenido de TG en el hígado, en animales agrupados como vacas con mayor intervalo parto-concepción (MaIPC) o menor intervalo parto-concepción (MeIPC).....	54

<b>Figura 18.</b> Expresión proteica de CPT1, ACOX1, PPAR $\alpha$ y DGAT1 en el hígado, en animales agrupados como vacas con mayor intervalo parto-concepción (MaIPC) o menor intervalo parto-concepción (MeIPC) .....	56
<b>Figura 19.</b> Concentraciones en LF de AGNE, BHB, glucosa, TG, insulina e IGF1, en animales agrupados como vacas con mayor intervalo parto-concepción (MaIPC) o menor intervalo parto-concepción (MeIPC) .....	57
<b>Figura 20.</b> Esquema de la pro-insulina. ....	66
<b>Figura 21.</b> Esquema del receptor de insulina. ....	67
<b>Figura 22.</b> Vía de señalización PI3K/Akt activada por el receptor de insulina.....	68
<b>Figura 23.</b> Diferencia entre la sensibilidad a la insulina y la respuesta a la insulina.....	69
<b>Figura 24.</b> Influencia de citoquinas inflamatorias en la resistencia insulínica. ....	71
<b>Figura 25.</b> Vías que vinculan la inflamación con la resistencia insulínica. ....	72
<b>Figura 26.</b> Protocolo de fraccionamiento celular. ....	75
<b>Figura 27.</b> Expresión proteica de IR, IRS1, PI3K, Akt, pAkt y pAkt/Akt en tejido hepático en animales agrupados como vacas con Alta Condición Corporal (ACC) o Baja Condición Corporal (BCC).....	81
<b>Figura 28.</b> Expresión proteica de IL6, TNF $\alpha$ , N-F $\kappa$ B nuclear y NF- $\kappa$ B citoplasmático en tejido hepático en animales agrupados como vacas con Alta Condición Corporal (ACC) o Baja Condición Corporal (BCC).....	82

## RESUMEN

---

A lo largo del ciclo productivo, las vacas lecheras sufren cambios extremos en su metabolismo capaces de afectar su salud y reproducción. El periodo de transición es la etapa más crítica para el animal, la cual se caracteriza por un desbalance energético con lipomovilización, incremento sistémico de ácidos grasos no esterificados y beta-hidroxiacetato. En este contexto se desarrollan la mayoría de las enfermedades, afectando la producción y la reproducción del ganado lechero. Por lo que el objetivo de esta tesis fue analizar las concentraciones de hormonas y metabolitos a nivel sistémico y folicular, la expresión génica y proteica de moléculas relevantes involucradas en el metabolismo de los ácidos grasos no esterificados, junto a intermediarios de la cascada de señalización de insulina, en un órgano clave como es el hígado, para relacionarlo con la adaptación al periodo de transición y la eficiencia reproductiva. Los hallazgos mostraron diferencias entre la expresión génica y proteica en algunas de las enzimas hepáticas del metabolismo de ácidos grasos, sugiriendo la existencia de posibles procesos post-traduccionales y una diferente interpretación de la vía oxidativa de ácidos grasos en el hígado de vacas. Por otro lado, en los animales sin diferencias evidentes en el balance energético negativo, encontramos una relación entre la mayor capacidad oxidativa de ácidos grasos, menor contenido de triglicéridos hepáticos y menores concentraciones de bilirrubina plasmática, con una mayor eficiencia reproductiva de los animales. En este sentido, la mayor capacidad oxidativa podría relacionarse a una mayor adaptación a la lipomovilización durante el parto, posibilitando un mejor rendimiento productivo y/o reproductivo. Por último, una alta condición corporal se asoció con una alteración en la señal de insulina en el hígado, sugiriendo una resistencia insulínica hepática en vacas postparto y acompañado de una mayor lipomovilización y estado proinflamatorio local. Estos resultados aportan nuevos conocimientos para un mejor entendimiento de la fisiología de la vaca lechera durante el periodo de transición.

## ABSTRACT

---

During the dairy life, cows suffer important changes in their metabolism that could affect their health and reproduction. The transition period is the most critical stage, which is characterized by a negative energy balance with lipomobilization and plasmatic increase in the concentration of non-esterified fatty acids and beta-hydroxybuturate. In this context, most of the developed diseases affect the production and reproduction of dairy cattle. Therefore, the aim of this thesis was to analyze the concentrations of hormones and metabolites in plasma and follicular fluid, and the gene and protein expression of relevant molecules involved in the non-esterified fatty acids metabolism along with intermediates of the insulin signaling, in a key organ such as the liver, to related with the adaptation to the transition period and reproductive efficiency of dairy cattle. The results showed differences between gene and protein expression in some of the liver enzymes of fatty acid metabolism, suggesting the existence of possible post-translational processes and a different interpretation of the oxidative pathway of fatty acids in the liver of cows. On the other hand, in animals without obvious differences in the negative energy balance, we found a relationship between a greater oxidative capacity of fatty acids, lower hepatic triglyceride content and lower plasma bilirubin concentrations, with a greater reproductive efficiency of the animals. In this sense, the greater oxidative capacity could be related to a greater adaptation to the lipomobilization during peripartum, allowing a better productive and/or reproductive performance. Finally, a higher body condition score was associated with an hepatic alteration in the insulin signal, suggesting insulin resistance in postpartum cows and accompanied by increased lipomobilization and local proinflammatory status. These results provide new knowledge for a better understand of the dairy cow physiology during the transition period.

# **CAPITULO I.**

Revisión bibliográfica y consideraciones  
generales

## I. 1. INTRODUCCION

En las últimas décadas la selección genética ha permitido incrementar notablemente la producción de leche por vaca (Oltenucu y Broom, 2010). Sin embargo, dicho aumento ha generado que las vacas deban adaptarse a los mayores requerimientos de energía y nutrientes, particularmente en las primeras semanas postparto, donde el consumo de materia seca (CMS) no se ha reestablecido y los animales se encuentran en balance energético negativo (BEN) (Sundrum, 2015). Es así, que en concordancia con el aumento de la producción láctea se ha elevado la prevalencia de enfermedades metabólicas en los animales (van Saun y Sniffen, 2014). A su vez, el mayor mérito genético para la producción láctea, junto a las implicancias antes mencionadas, se ha asociado a detrimentos en la eficiencia reproductiva de las vacas lecheras (Butler, 2000). En este sentido, Royal *et al.* (2000) han demostrado que al duplicarse la producción de leche se triplican los problemas reproductivos, pudiendo generar grandes problemas económicos en los tambos ya que la eficiencia reproductiva es uno de los principales factores que influyen en la rentabilidad de un tambo (Giordano *et al.*, 2011; Cattaneo *et al.*, 2015).

Los problemas asociados a la mayor demanda energética y de nutrientes de las vacas lecheras tienen particular importancia durante el denominado periodo de transición (PT) o periparto. Este periodo, comprendido entre las tres semanas previas y las tres semanas posteriores al parto, representa el momento más crítico del ciclo productivo de la vaca lechera donde se producen los mayores cambios metabólicos, endocrinos y en los requerimientos del animal, pasando estar gestante y sin producción de leche a no gestante y produciendo importantes cantidades de leche (Grummer, 1995). Durante este tiempo se producen la mayoría de las disfunciones metabólicas (cetosis, hígado graso, edema de ubre), nutricionales (hipocalcemia, hipomagnesemia), alimenticias (acidosis ruminal, desplazamiento de abomaso), infecciosas (mastitis, metritis, abscesos hepáticos) y productivas (disminución en la producción de leche, relación grasa:proteína invertida) (Ospina *et al.*, 2010a; Roche *et al.*, 2013a). Drackley (1999) describió al PT como la mayor limitante en la producción lechera y en los últimos años numerosos investigadores se han enfocado en este periodo intentando resolver los problemas anteriormente mencionados, los cuales mantienen tasas de prevalencia estables o en incremento (van Saun y Sniffen, 2014). Por este motivo, los conocimientos sobre diferentes aspectos metabólicos continúan representando un desafío para la comprensión de esta etapa crítica en el ciclo de lactancia.

A continuación, y a modo de introducción general, se describen generalidades de la fisiología digestiva y el metabolismo en rumiantes, particularmente en la vaca lechera durante el PT, para luego abocarnos al desarrollo de los tres siguientes estudios que integran esta tesis.

### ***I. 1. 1. Adaptaciones fisiológicas de la vaca en transición***

Durante la vida productiva, una vaca lechera transita por etapas sucesivas de lactancia y periodos no lactantes. Este periodo no lactante, también denominado de “vaca seca” dura aproximadamente unos 60 días y permite la involución de la glándula mamaria y la preparación de ésta para una nueva lactancia. En los últimos años se originaron discusiones importantes sobre la reducción u omisión del período seco de vacas lecheras de alta producción. Diferentes estudios han demostrado los beneficios de la ausencia o la reducción de este período para la salud de las vacas lecheras durante la lactancia temprana, principalmente reduciendo el BEN y aumentando el CMS (Pezeshki *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2015a). Sin embargo, en contraposición, se demostró que la ausencia o la reducción del período seco resultó en una menor producción de leche durante la lactancia posterior, especialmente en vacas previo a su segunda lactancia, con pérdidas de hasta el 16% en la producción de leche (Pezeshki *et al.*, 2007; van Hoeij *et al.*, 2017).

El periodo seco suele dividirse en dos etapas según los fenómenos fisiológicos y metabólicos predominantes. La primera etapa corresponde al denominado “periodo seco fresco” y abarca desde la finalización de la lactancia hasta los 30-21 días previos a la fecha probable de parto. En esta etapa se busca lograr una involución correcta de la glándula mamaria y evitar las pérdidas en la producción lechera en la próxima lactancia. De esta forma disminuye la energía aportada, principalmente reduciendo el aporte de cereales en la dieta, lo que permite reducir la producción láctea. La segunda etapa contempla los 30-21 días previos al parto, donde se busca preparar a la vaca para los cambios drásticos que se van a dar en el mismo, de manera de mejorar el rendimiento y la salud en la futura lactancia, particularmente en el comienzo de la misma. Las modificaciones durante el ciclo productivo de la vaca lechera obligan a una serie de cambios del metabolismo ruminal y sistémico, cuyos aspectos más importantes se describirán a continuación.

#### ***I. 1. 1. 1. Adaptaciones ruminales***

Los rumiantes poseen la capacidad de alimentarse de pasto o forraje seco gracias a la presencia de diferentes tipos de microorganismos alojados en los pre-estómagos. Particularmente, el retículo-rumen de los bovinos es una gran cámara de fermentación que

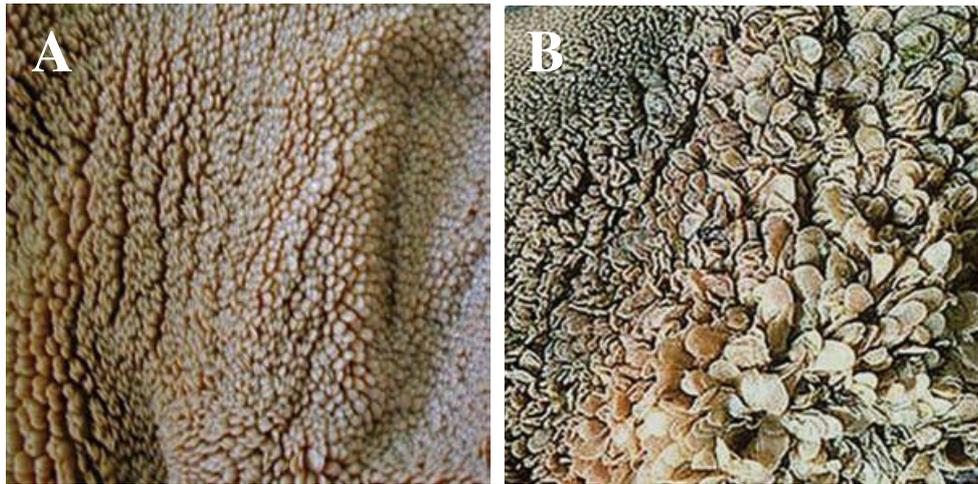
contiene un ecosistema microbiano complejo formado por bacterias, protozoos, arqueas, hongos y bacteriófagos que trabajan en una relación dinámica y simbiótica con el huésped. Este ecosistema microbiano tiene la capacidad de degradar los hidratos de carbono estructurales de los forrajes, permitiendo al bovino utilizar estos nutrientes que son muy poco aprovechables por las especies no rumiantes. Sin embargo, la digestión fermentativa tiene otras implicancias, principalmente en el metabolismo, ya que afecta a los restantes componentes de la dieta que son expuestos a los mismos procesos fermentativos. Por ejemplo, la mayoría de la glucosa proveniente de la degradación de los hidratos de carbono del alimento es fermentada en el rumen y, en consecuencia, la principal fuente de glucosa para los rumiantes proviene de la gluconeogénesis hepática, resultando ser el propionato su principal sustrato. Otro cambio importante producido por la fermentación ruminal es sobre los ácidos grasos. Tanto los forrajes como las semillas poseen un elevado porcentaje de ácidos grasos insaturados, gran parte de ellos esenciales, como el ácido linoleico (C18:2 n-6) y el alfa-linolénico (C18:3 n-3). Sin embargo, la cantidad de los ácidos grasos insaturados que llegan al intestino delgado es mínima debido al proceso de biohidrogenación ruminal. En este contexto, es interesante considerar que al alimentar al rumiante en realidad se está alimentando a los microorganismos ruminales, cuyo ecosistema es muy sensible a los cambios de la dieta, los cuales son muy importantes desde el secado de la vaca hasta el inicio de una nueva lactancia.

Entre otras cosas, en los bovinos, la dieta preparto intenta adaptar al rumen a los cambios producidos por el pasaje de una dieta basada en forrajes durante el secado (donde predominan los carbohidratos estructurales como la celulosa) a una dieta con mayor contenido de concentrados durante la lactancia (con mayor contenido de almidón). La celulosa es un homopolisacárido lineal de unidades de glucosa unidas por enlaces beta 1-4 glucosídicos, razón por la cual gran parte de los animales no la pueden usar como combustible ya que carecen de una enzima capaz de hidrolizar dichos enlaces pero que sí poseen las bacterias ruminales. Por su parte, los granos proporcionan una cantidad apreciable de almidón para la digestión ruminal e intestinal y consiste en cadenas de residuos de glucosa conectadas por enlaces alfa 1-4 glucosídicos. La incorporación de almidón en la dieta preparto y de la lactancia implica reajustes en el metabolismo de los animales y en su microflora ruminal, que varía en unos 3 a 5 días desde Gram- celulolítica a Gram+ amilolítica. Esta nueva flora ruminal produce cantidades elevadas de ácido láctico y su acumulación, a consecuencia de las grandes cantidades ruminales de almidón, puede conducir a cuadros de acidosis subaguda descritas en vacas postparto. La acumulación de lactato dentro del rumen se puede reducir al adaptar la flora ruminal, permitiendo el desarrollo de bacterias que metabolicen el ácido láctico a ácidos grasos

volátiles (AGV); sin embargo, el desarrollo de dichas bacterias es lento, de aproximadamente tres a cuatro semanas (García y Montiel, 2011).

La adaptación ruminal, además de los cambios en la flora ruminal, tienen implicancias en el perfil y la cantidad de nutrientes absorbidos por el animal. El rumen es un ambiente anaeróbico, por lo que los microorganismos sólo disponen de la vía glucolítica para obtener energía, produciendo AGV como un producto de desecho, siendo los principales los ácidos acético, propiónico y butírico. Las dietas ricas en forraje aumentan la proporción de ácido acético en el rumen, mientras que los alimentos ricos en cereales aumentan la proporción de ácido propiónico. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que estos valores representan proporciones relativas y no cantidades absolutas. La cantidad total de AGV producida con una dieta rica en almidón suele ser mucho mayor que la obtenida con una dieta rica en fibra, al punto que la producción total de ácido acético puede ser mayor con la primera, aunque su producción relativa con respecto al resto de los AGV pueda verse reducida.

La mayor producción de AGV ha sido asociada al aumento del tamaño de las papilas ruminales (Figura 1). Durante el periodo seco fresco el tamaño papilar disminuye pudiendo reducir hasta un 50% la superficie de absorción. De esta forma, la incorporación de almidón en la dieta es importante para el desarrollo papilar, lo que permite una mayor absorción de AGV y lactosa en la pared ruminal, mejorando la captación de estos nutrientes y disminuyendo el riesgo de acidosis (Dirksen *et al.*, 1985). Estos resultados, han originado manejos donde se incorporan grandes cantidades de carbohidratos no estructurales en la dieta del parto para mejorar el desarrollo de las papilas. Sin embargo, tal recomendación es una extrapolación aventurada, basados en resultados en donde el desarrollo de las papilas mejoró en vacas alimentadas con una dieta rica en cereales en comparación con aquellas alimentadas con forraje de baja calidad (Roche *et al.*, 2013a). Trabajos posteriores al de Dirksen *et al.* (1985) mostraron que dietas con altos contenidos de almidón no tenían ventajas en el desarrollo ruminal en comparación con concentraciones moderadas del mismo (Andersen *et al.*, 1999). Además, en los últimos años, numerosos estudios han reportado los beneficios de dietas controladas con menor energía para vacas parto a fin de evitar el riesgo de hígado graso y cetosis (Dann *et al.*, 2006; Looor *et al.*, 2006; Roche *et al.*, 2015).



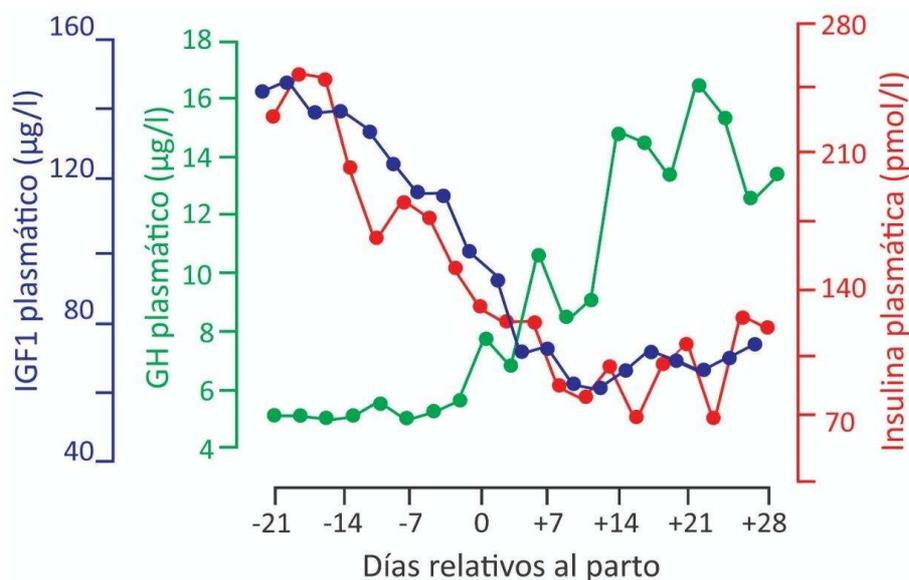
**Figura 1.** Papilas ruminales antes (A) y después (B) de la adaptación ruminal preparto. Adaptado de Lean y DeGaris (2010).

### *I. 1. 1. 2. Adaptaciones endocrinas*

Los cambios metabólicos observados en el periparto de la vaca lechera obedecen a los cambios hormonales que se producen con el propósito de re-direccionar los nutrientes para la producción de leche.

La glucosa es el precursor principal de la síntesis de lactosa, y esta última controla el volumen de leche manteniendo su osmolaridad. El PT se caracteriza por una disminución marcada en las concentraciones de glucosa y, consecuentemente, por una disminución en la síntesis y secreción de insulina por las células beta del páncreas. La insulina regula la captación de glucosa a través de los transportadores GLUT-4 que se expresan fundamentalmente en los tejidos musculares estriado y cardíaco, y en el tejido adiposo. La glándula mamaria bovina expresa los transportadores GLUT-1, GLUT-8, GLUT-12 y los transportadores de glucosa acoplados a sodio SGLT-1 y SGLT-2, lo que posibilita que la captación de glucosa de este órgano sea independiente de los niveles plasmáticos de insulina (De Koster y Opsomer, 2013). Más aún, estudios previos indican que durante el PT, la expresión de los transportadores GLUT-1, GLUT-8, GLUT-12, SGLT-1 y SGLT-2 aumenta de cinco a más de cien veces (Zhao y Keating, 2007). Este fenómeno le permite a la glándula mamaria captar hasta un 97% de toda la energía suministrada por la nutrición (Drackley, 1999). Además, en vacas lecheras de alta producción se ha descrito un cuadro de insulino-resistencia similar a la diabetes tipo II humana, registrándose una disminución en la respuesta de los tejidos sensibles a la insulina (De Koster y Opsomer, 2013). Así, las bajas concentraciones de insulina y la resistencia parcial a la misma direccionan aún más las reservas de glucosa hacia la glándula mamaria, donde su ingreso es independiente de la hormona pancreática.

Por otro lado, la concentración plasmática de la hormona de crecimiento (GH, por sus siglas en inglés) aumenta rápidamente después del parto, debido al desacople del eje somatotrófico. Se ha descrito que dos días antes del parto, los receptores de GH (GHR, por sus siglas en inglés) en el hígado disminuyen, permaneciendo bajos durante una semana, y aumentando lentamente durante la segunda semana postparto (Radcliff *et al.*, 2003). En consecuencia, disminuye la secreción del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1, por sus siglas en inglés), el cual actúa sobre el hipotálamo e hipófisis para controlar la secreción de GH a través de un mecanismo de retroalimentación negativa (Figura 2). El proceso de “reacoplamiento” del eje somatotrófico ha sido relacionado con la nutrición postparto y el balance energético y parece ser un proceso dependiente de insulina (Butler *et al.*, 2003).



**Figura 2.** Concentraciones plasmáticas de GH, insulina e IGF1 desde los 21 días anteriores hasta los 28 días posteriores al parto. Adaptado de Rhoads *et al.* (2004).

Los efectos de la insulina sobre la expresión de los GHR y del IGF1 pueden analizarse en forma combinada para lograr comprender mejor la lactancia temprana. Los GHR en el hígado disminuyen inmediatamente previo del parto, conduciendo a un descenso en la síntesis hepática de IGF1 y, en consecuencia, en la concentración sistémica de IGF1, lo que provoca una reducción de la retroalimentación negativa sobre la GH y un aumento en su concentración sistémica. Dicho aumento de GH provoca una mayor gluconeogénesis hepática y promueve la lipólisis en el tejido adiposo. Sumado a esto, los niveles de insulina disminuyen durante este período debido a que las concentraciones de glucosas son bajas. Por lo tanto, los bajos niveles de insulina mantienen disminuidos los GHR en el hígado. No obstante, el descenso de los

niveles de insulina tiene un efecto opuesto sobre el tejido adiposo, donde la expresión de los GHR aumenta en respuesta a la disminución de insulina (Butler *et al.*, 2003). El aumento de los GHR del tejido adiposo incrementa la respuesta a la GH y a consecuencia aumenta la movilización grasa. Las altas concentraciones de GH y AGNE durante este período antagonizan la acción de la insulina y crean un estado de insulino-resistencia (De Koster y Opsomer, 2013). Finalmente, la disminución en los niveles de insulina junto a la resistencia a dicha hormona dificulta la captación de la glucosa por los tejidos extramamarios y se promueve su reserva para la síntesis de leche.

Todas las adaptaciones endocrinas del periparto previamente descritas pueden resultar naturales en la fisiología de la vaca lechera para favorecer la producción láctea. Sin embargo, un incremento en la intensidad o en la duración de dichas adaptaciones puede ocasionar efectos secundarios perjudiciales, particularmente sobre la reproducción y en el desarrollo de enfermedades metabólicas e infecciosas.

### ***I. 1. 2. Balance Energetico durante el periodo de transición***

El balance energético es la diferencia entre el consumo de energía por parte del animal y la energía que requiere para su mantenimiento, la preñez y/o la lactancia. En el postparto inmediato los requerimientos del animal aumentan en forma abrupta (Tabla 1). Este incremento en los requerimientos surge como resultado de décadas de selección para obtener una alta producción de leche, por lo que es común que las vacas lecheras produzcan diez veces más leche de lo necesario para satisfacer los requerimientos de la cría.

Además del aumento de los requerimientos para la producción de leche, al igual que en muchas especies mamíferas, el periparto en vacas lecheras se caracteriza por la supresión del apetito, siendo el consumo el más bajo del ciclo gestación-lactancia (Grummer *et al.*, 2004). De esta forma, en el postparto, el gasto de energía es mayor que el consumo y el balance energético resulta negativo (Heuer *et al.*, 2000), ocasionando una pérdida de condición corporal (CC). El grado de disminución en el CMS determina en gran parte el grado de lipomovilización, con los respectivos incrementos plasmáticos de AGNE y beta-hidroxibutirato (BHB), lo que aumenta el riesgo de trastornos metabólicos, particularmente de cetosis (Allen y Piantoni, 2013; Ospina *et al.*, 2013).

**Tabla 1.** Requerimiento energético pre y postparto de vacas Holstein calculados como energía neta de lactancia (ENL) (MJ/d).

<b>Función</b>	<b>Múltipara de 725 kg</b>		<b>Primípara de 570 kg</b>	
	-2 días	+2 días	-2 días	+2 días
<b>Mantenimiento</b>	46,9	42,2	38,9	35,6
<b>Gestación</b>	13,8	---	11,7	---
<b>Crecimiento</b>	---	---	7,9	7,1
<b>Producción láctea</b>	---	78,2	---	62,3
<b>Total</b>	60,7	120,4	58,5	105,0

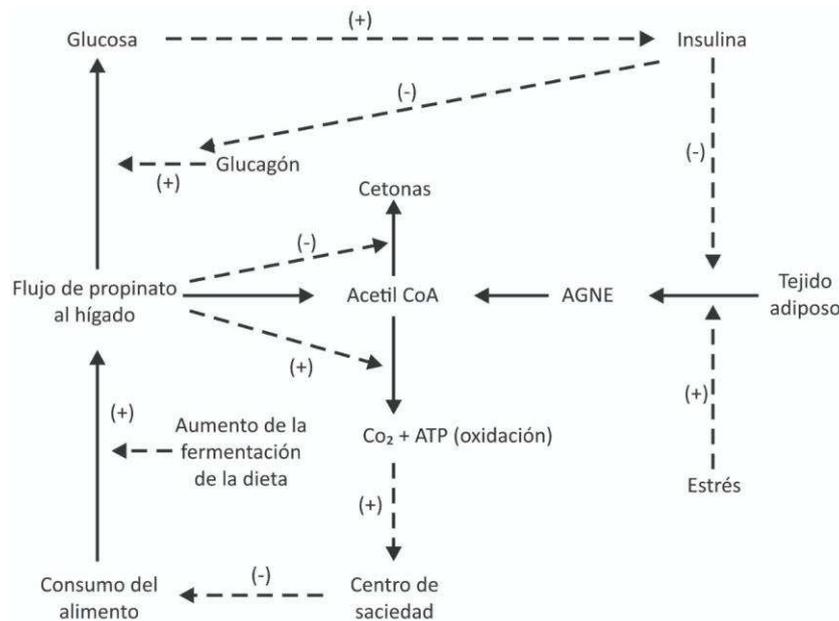
Calculado a partir del Consejo Nacional de Investigación (2001). Se asume un peso corporal de preparto para las vacas Holstein con una disminución promedio de la pérdida de terneros y líquidos al momento del parto, producción de leche de 25 kg/d para vacas múltiparas y 20 kg/d para vacas primíparas y leche con un 4% de grasa para cada una. Drackley *et al.* (2005).

#### *I. 1. 2. 1. Consumo en la vaca lechera peripartal*

Una variedad de factores interactúan para afectar el consumo de alimento de las vacas lecheras, incluida la dieta, el manejo, el medio ambiente, la producción de leche y su estado fisiológico (por ejemplo, la concentración de insulina y la insulino-sensibilidad de los tejidos). Los mecanismos de control de la ingesta de alimento son complejos e involucran múltiples señales, redundancias y niveles de integración. La conducta de alimentación está controlada por centros de alimentación cerebral en el hipotálamo que reciben señales periféricas de aferentes en el hígado y el intestino, así como también de metabolitos y hormonas.

El relleno físico en el rumen se ha estudiado ampliamente (Allen, 1996). La distensión del rumen, determinado principalmente por la fibra detergente neutra (FDN) forrajera, se detecta mediante receptores de tensión ubicados principalmente en el retículo y el saco craneal del rumen. Sin embargo, se ha visto que estos procesos dominan el control de la ingesta de alimento durante los períodos de mayor producción de leche y no al comienzo de la lactancia, lo cual ha dado lugar al desarrollo de dietas con una mayor cantidad de fibra en el postparto inmediato (Allen y Piantoni, 2013). A su vez, el paso de contenido por el sistema digestivo genera la secreción de distintos péptidos intestinales que potencialmente contribuyen al control de la ingesta de alimento incluyendo ghrelina, colecistoquinina y el péptido similar a la glucosa 1 (Relling y Reynolds, 2008).

En los últimos años, Allen *et al.* (2009) desarrollaron la denominada Teoría de la Oxidación Hepática (HOT, por sus siglas en inglés), a partir de observaciones en animales de laboratorio. Ésta sugiere que la estimulación de la oxidación hepática inhibe la alimentación, mientras que la inhibición de la oxidación estimula la alimentación a través de aferentes hepáticos vagales (Allen y Bradford, 2012). El estado de oxidación hepático está determinado por el equilibrio entre la tasa de producción de enlaces fosfato de alta energía (ATP), a partir de la oxidación de los combustibles y la tasa de utilización. En bovinos, los combustibles extraídos de la sangre y oxidados en el hígado de rumiantes incluyen AGNE, glicerol, lactato y aminoácidos (movilizados de las reservas corporales, producidos por el metabolismo de otros combustibles y proporcionados por la dieta), así como propionato y butirato, producidos por los microorganismos ruminales. El hígado no extrae ni el acetato ni la glucosa de la sangre, debido a que la actividad de las enzimas requeridas para su activación y el metabolismo subsiguiente es baja en el hígado de los rumiantes. De esta forma, el elevado flujo de AGNE al hígado podría ser la causa de la depresión de la ingesta de alimento durante el parto, en concordancia con la relación temporal inversa entre la concentración de AGNE plasmáticos y el CMS observado en diversos estudios. Por otra parte, se han reportado ampliamente los efectos hipofágicos de las infusiones de propionato en rumiantes. El propionato se produce principalmente por la fermentación ruminal del almidón y es captado de manera eficiente por el hígado para la gluconeogénesis. Cuando la captación de propionato es alta, superando la concentración necesaria para la vía de síntesis hepática de glucosa, éste puede oxidarse hasta acetyl-CoA. Cuando las vacas están en un estado lipolítico y la concentración de acetyl-CoA hepática está elevada, se inhibe la oxidación del propionato y el propionato puede emplearse como precursor de glucosa. Sin embargo, la entrada de propionato en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA, por sus siglas en inglés) puede estimular la oxidación de acetyl-CoA, generando ATP y aumentando la carga de energía (Figura 3). El control de la ingesta de alimento por el propionato en el parto, ha dado lugar al desarrollo de dietas para el postparto inmediato con mayor cantidad de fibra (Allen y Piantoni, 2013).



**Figura 3.** Teoría de oxidación hepática para el control de la ingesta. Líneas continuas: flujo de carbonos. Líneas discontinuas: estimulación/inhibición del flujo. Adaptado de (Allen y Piantoni, 2013).

### *I. 1. 2. 2. Condición corporal, movilización grasa y funcionalidad hepática.*

La CC es una medida indirecta del grado de lipólisis del animal, resultando su control un elemento importante en los tambos actuales en cuanto a la prevención de enfermedades del periparto (Friggens *et al.*, 2004; Roche *et al.*, 2009). Desde el parto hasta el final del BEN la pérdida de CC no debería ser menor a 1 punto, en una escala de cinco puntos (Edmonson *et al.*, 1989). A su vez, una CC mayor a 3,5 puntos al parto ha sido relacionada a CMS menores y por lo tanto, a un mayor grado de lipólisis y predisposición a una mayor incidencia de cetosis y lipidosis hepática.

La cetosis puede ser secundaria a otras enfermedades que deprimen el CMS y aumentan el BEN, también puede ser primaria sin causa aparente. En ambos casos, la supresión del consumo de alimento por oxidación hepática de AGNE es probablemente un factor contribuyente. La captación hepática de AGNE es proporcional a su concentración en la sangre. Se ha demostrado que un aumento notorio en la concentración de triglicéridos (TG) hepáticos es el resultado de la alta concentración plasmática de ANGE y la limitada capacidad para exportar TG como lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, por sus siglas en inglés) en los rumiantes (Kleppe *et al.*, 1988). Esto compromete la función hepática, reduciendo la gluconeogénesis y por lo tanto, la restauración de la glucosa en sangre y las concentraciones de insulina, lo que promueve aún más el estado lipolítico. A su vez, el alto contenido de ácidos grasos en el hígado sobrepasa la capacidad de su metabolización produciéndose en

consecuencia BHB, y aumentando también en la circulación. En este sentido, la funcionalidad del hígado se convierte en un elemento central, y para su evaluación se pueden analizar las clásicas enzimas hepáticas que indican daño tisular como la aspartato transaminasa (AST) y la gamma-glutamil transpeptidasa (GGT); y parámetros de funcionalidad hepática como bilirrubina y fosfatasa alcalina (FA). En los últimos años, para evaluar la funcionalidad hepática, ha crecido el interés por el estudio de las denominadas proteínas de fase aguda (PFA) las cuales son sintetizadas principalmente a nivel hepático en respuesta al estado de lipomovilización (Bertoni y Trevisi, 2013). Estas proteínas se designan como PFA positivas (PFA+) como haptoglobina, ceruloplasmina, entre otras; cuando aumentan frente a estados proinflamatorios; y PFA negativas (PFA-) cuando disminuyen como albúmina, lipoproteínas, proteína de unión a retinol, y otras enzimas y proteínas sintetizadas por el hígado. En este sentido, principalmente las PFA- se han tomado como parámetros de funcionalidad hepática, así como elementos que se encuentran relacionados a éstas como el colesterol y el clearance de bilirrubina.

Por todo lo anteriormente expuesto, ha crecido el interés por el estudio de aquellas vías hepáticas que intervienen en el metabolismo de los ácidos grasos y otros lípidos, así como también aquellos elementos moleculares que pueden resultar claves para mejorar la transición de la vaca lechera. Es por ello, que nos planteamos como hipótesis general de este trabajo que: ***"Alteraciones en los múltiples factores que intervienen en la regulación metabólica durante el período de transición de bovinos lecheros de alta producción podrían afectar su desempeño reproductivo"***.

## **I. 2. OBJETIVOS**

### ***I. 2. 1. Objetivo general***

Estudiar el perfil metabólico en vacas de alta producción, mediante la evaluación de la expresión de enzimas hepáticas y los niveles circulantes de productos asociados al metabolismo lipídico, y la relación con parámetros reproductivos y el estado nutricional del animal.

### ***I. 2.2. Objetivos específicos***

1. Analizar los factores de transcripción claves asociados al metabolismo hepático de lípidos en vacas en diferentes etapas del PT.
2. Analizar enzimas importantes asociadas al metabolismo hepático de lípidos en vacas en diferentes etapas del PT.
3. Evaluar las concentraciones séricas de AGNE, TG y BHB en bovinos en diferentes momentos del PT.
4. Determinar las concentraciones intrafoliculares de AGNE y BHB durante el período de reanudación de la actividad ovárica postparto.
5. Determinar la relación entre parámetros reproductivos con el perfil metabólico en vacas de alta producción.
6. Analizar en biopsias hepáticas alguno de los componentes que participan en la vía de señalización PI3K de la insulina.
7. Estudiar algunos componentes que relacionan los procesos inflamatorios con la sensibilidad insulínica hepática.

## **CAPÍTULO II.**

Estudio I: Expresión génica y proteica de moléculas relacionados al metabolismo de los lípidos hepáticos en vacas lecheras en pastoreo durante el período de transición

## II. 1. INTRODUCCIÓN

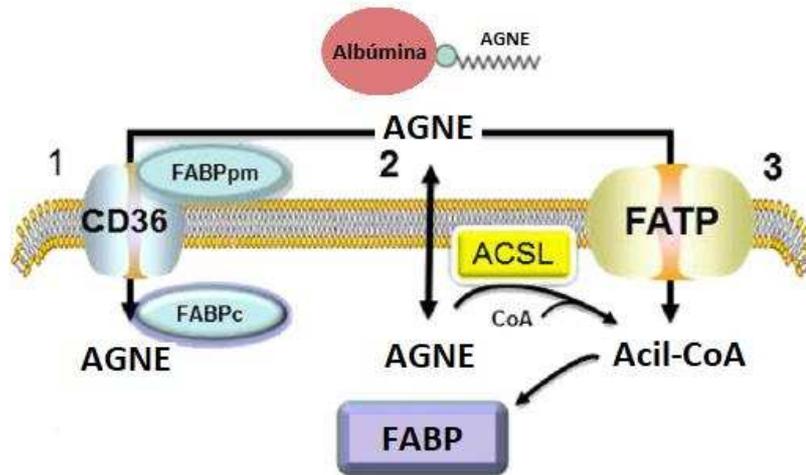
En la mayoría de las especies, el hígado se considera un "órgano buffer" que censa el estado nutricional del organismo y que, orquestado por la regulación hormonal, es capaz de coordinar la respuesta metabólica al ayuno y la ingesta (Loor *et al.*, 2005; Hein *et al.*, 2010). Durante el parto, las vacas lecheras sufren un desequilibrio energético debido a la creciente demanda de nutrientes para el crecimiento fetal y la síntesis de leche (Wathes *et al.*, 2007). En este período, el hígado desempeña un papel crítico al tratar de lidiar con la mayor afluencia de AGNE como consecuencia del aumento en la lipólisis del tejido adiposo para obtener la energía necesaria (Loor *et al.*, 2007; van Dorland *et al.*, 2009; LeBlanc, 2010). En este sentido, diferentes vías enzimáticas pueden encargarse del metabolismo de estos AGNE en el hígado.

### II. 1. 1. Movilización de AGNE

En el tejido adiposo, los TG se sintetizan a partir de los acil-CoA-tioésteres (acil-CoA) y el glicerol 3-fosfato y en forma inversa, los TG se hidrolizan a ácidos grasos y glicerol, originándose ciclos continuos de lipólisis y re-esterificación. Durante el postparto de la vaca lechera, la re-esterificación no logra igualar la lipólisis, incrementándose la cantidad de AGNE disponibles en vía sistémica (Drackley *et al.*, 2005). Esto se debe a una mayor activación de la lipasa hormono sensible por el ambiente hormonal propio de esta etapa, caracterizado entre otras cosas por una disminución de los niveles de insulina y el aumento de la GH (Sordillo y Raphael, 2013). De esta forma, aumentan las concentraciones plasmáticas de AGNE que circulan unidos a la albúmina. Éstos ácidos grasos, y aquellos que circulan como moléculas integrantes de las diferentes lipoproteínas, pueden ingresar al interior celular por diferentes mecanismos. Es así que el ingreso de los ácidos grasos de pocos carbonos (< 12) a los hepatocitos se realiza por difusión simple y aquellos ácidos grasos con número mayor de carbonos lo hacen a través de proteínas de transporte de ácidos grasos de membrana (FATP, por sus siglas en inglés) o a través de la proteína CD36, una proteína que se une a los ácidos grasos y los transloca junto a proteínas de unión a ácidos grasos (FABP, por sus siglas en inglés) (Park *et al.*, 2014; Glatz y Luiken, 2017). Este último complejo transportador se encuentra en vesículas intracelulares y se integra a la membrana plasmática frente a determinados estímulos como la insulina (Glatz y Luiken, 2017).

En el compartimento intracelular los ácidos grasos se unen inmediatamente a la coenzima A (CoA) para formar acil-CoA, de lo contrario serían tóxicos para las células, y resulta una condición imprescindible para luego participar en las diferentes vías metabólicas. Este proceso es catalizado por la enzima acil-CoA sintasa hepática (ACSL) que se encuentra

anclada en la membrana celular. Posteriormente, el acil-CoA se une a una FABP que facilita su solubilización y posibilita su transporte a los diferentes compartimentos celulares (Figura 4). Alternativamente, los acil-CoA pueden ser incorporados en lípidos más complejos como los TG y fosfolípidos, ser oxidados, o tener efectos importantes sobre la regulación génica y diferentes vías de señalización intracelular.



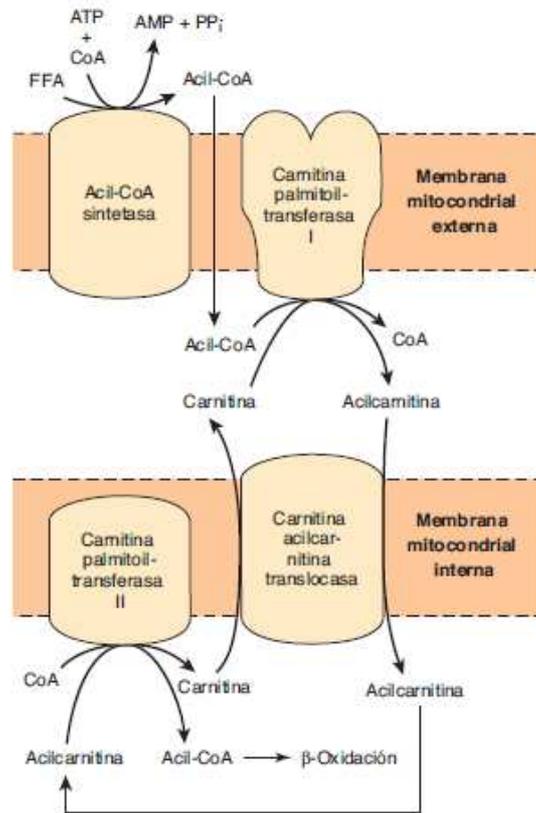
**Figura 4.** Captación hepática de AGNE circulantes por medio de proteínas transportadoras. Adaptado de Hardwick et al., (2013).

## II. 1. 2. Oxidación de ácidos grasos

Una de las vías metabólicas que pueden seguir los ácidos grasos dentro de la célula es la oxidación hasta acetil-CoA. Este proceso no es la inversa de su biosíntesis, sino que es un proceso diferente que tiene lugar en organelas de la célula, ya sea en mitocondrias o peroxisomas. En los rumiantes, la oxidación de los ácidos grasos ocurre aproximadamente en un 50% en cada organela, mitocondrias y peroxisomas, a diferencia de los no rumiantes, donde la oxidación de los ácidos grasos ocurre principalmente en las mitocondrias (76%) (Grum *et al.*, 1994).

En la oxidación mitocondrial es fundamental la enzima carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT1) ubicada en la membrana mitocondrial externa, permitiendo convertir el acil-CoA de cadena larga en acilcarnitina. De esta manera, el ácido graso es capaz de penetrar en la membrana interna y junto a la CPT2, tener acceso al sistema de enzimas de la  $\beta$ -oxidación (Figura 5). El rol regulador de la CPT1 en la oxidación de ácidos grasos se ha estudiado ampliamente en no rumiantes durante diferentes estados fisiológicos y patológicos (Dann y Drackley, 2005). La actividad CPT1 se encuentra disminuida en estado post-prandial, mientras que aumenta en ayunas promoviendo la oxidación de los ácidos grasos. Las altas

concentraciones citoplasmáticas de malonil-CoA inhiben la actividad de CPT1, disminuyendo la entrada de ácidos grasos al compartimento mitocondrial y en consecuencia la  $\beta$ -oxidación (Foster, 2012).



**Figura 5.** Función de la carnitina en el transporte de ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana mitocondrial interna. Botham y Mayes (2013).

Los acil-CoA que ingresan a la mitocondria son oxidados por un proceso denominado  $\beta$ -oxidación, a partir del cual el ácido grado se separa en moléculas de dos carbonos en ciclos repetidos formando acetil-CoA. De esta forma, por ejemplo, de un ácido graso de 16 carbonos (palmitoil-CoA) se forman ocho moléculas de dos carbonos (acetil-CoA) (Figura 6).

En los peroxisomas existe otra vía de  $\beta$ -oxidación que oxida fundamentalmente los ácidos grasos de cadena larga (> 20 carbonos) y finaliza en ácidos grasos de 8 átomos de carbono que se redirigen a la mitocondria para finalizar su oxidación. Algunas de las enzimas que participan en este camino son diferentes a las que intervienen en la oxidación mitocondrial, pero las etapas metabólicas son semejantes. La primera de estas etapas es catalizada por la enzima acil-CoA oxidasa 1 (ACOX1), de manera idéntica a la primera reacción mitocondrial, con la diferencia de que el retorno a la forma oxidada de flavín adenín dinucleótido (FAD) no se hace cediendo los protones a la cadena respiratoria si no reduciendo  $O_2$  a  $H_2O_2$ . Por lo tanto,



evidente que un mayor BEN refleja una mayor lipomovilización y una mayor oxidación de ácidos grasos en el hígado permitiendo un aumento en la cetogénesis o síntesis de cuerpos cetónicos. En este sentido, se ha visto que la inhibición de CPT1 disminuye la síntesis de cuerpos cetónicos (Foster, 2012). Sin embargo, además existe un control directo de la cetogénesis en función de la bidisponibilidad del oxalacetato y su unión al acetil-CoA para posibilitar su ingreso al TCA. A su vez, el oxalacetato se genera a partir de precursores gluconeogénicos. Es importante recordar que los rumiantes absorben bajas cantidades de glucosa en el intestino debido a que la misma es metabolizada por las bacterias ruminales. De esta forma la glucosa se sintetiza en la gluconeogénesis, principalmente a partir de propionato. A esta situación, se le suma la alta demanda de glucosa para la síntesis de lactosa durante la lactancia de la vaca lechera. Por lo tanto, los compuestos gluconeogénicos suelen ser escasos durante el postparto promoviendo la cetogénesis. En este sentido, se ha visto que el incremento de succinil-CoA (intermediario del TCA) como resultado de un aumento en el flujo de metabolitos glucogénicos, provoca la inhibición de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa mitocondrial (HMG-CoAS), regulando en forma directa la cetogénesis.

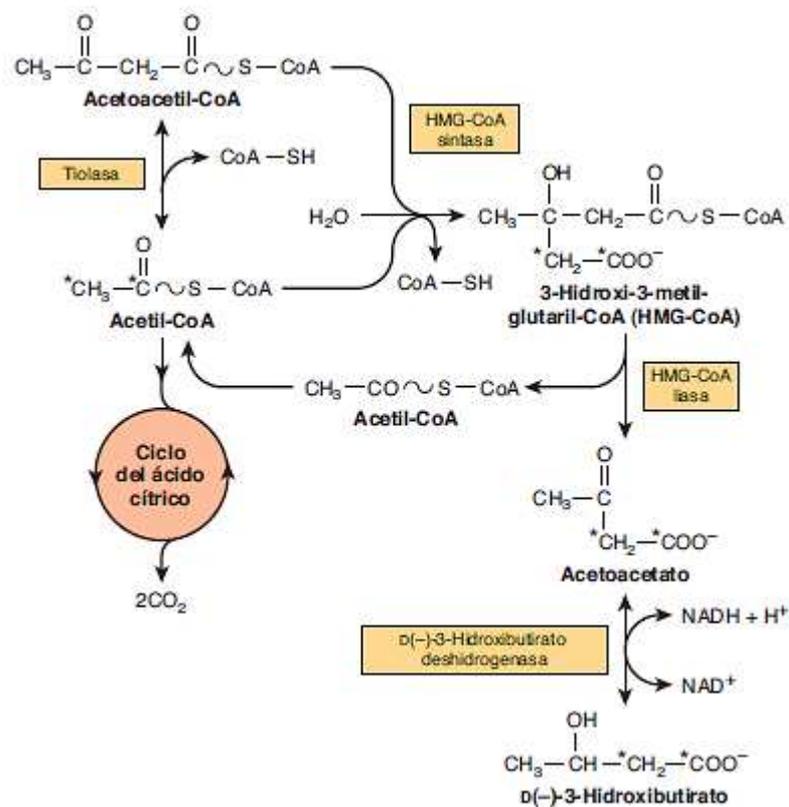


Figura 7. Síntesis de cuerpos cetónicos. Botham y Mayes (2013).

#### II. 1. 4. Síntesis de triglicéridos

Otra vía metabólica para los ácidos grasos que arriban al hígado es su re-esterificación a TG. Este proceso es catalizado por las enzimas: glicerol-3-fosfato-aciltransferasa, 1-acilglicerol-3-fosfato-aciltransferasa, la fosfatidato fosfohidrolasa y la enzima diacilglicerol-aciltransferasa (DGAT). La DGAT cataliza el único paso específico para la síntesis de TG y se cree que es limitante en prácticamente todas las circunstancias (Botham y Mayes, 2013). Se han descrito dos isoformas DGAT1 y DGAT2 y se ha demostrado que la isoforma 2 es más activa a bajas concentraciones de sustrato (por ejemplo, durante la síntesis *de novo* de ácidos grasos) y que la isoforma 1 es más activa con altas concentraciones de sustrato, como por ejemplo ante la presencia de ácidos grasos exógenos o incrementada lipólisis (Yen *et al.*, 2008).

Relacionado al BEN, al incremento en la lipólisis y al consecuente aumentado flujo de AGNE hacia el hígado y re-esterificación de los mismos, se ha descrito el desarrollo del hígado graso, una de las principales enfermedades metabólicas del periparto caracterizada por el acúmulo de TG (Sordillo y Raphael, 2013). Dicho aumento en el contenido de TG hepáticos se asocia con la disminución de sus funciones y la consecuente disminución en el estado de salud y aptitud reproductiva de la vaca lechera (Bobe *et al.*, 2004).

#### II. 1. 5. Secreción hepática de lipoproteínas

Los TG almacenados en el hígado son secretados a la circulación integrando a las VLDL junto a las apoproteínas (Apo) B100 y Apo B48. Las mismas son sintetizadas en el retículo endoplasmático rugoso e incorporadas a las lipoproteínas en el retículo endoplasmático liso. Luego de dirigirse en vesículas de transporte hacia el aparato de Golgi, las lipoproteínas son glucosiladas y migran hacia la membrana sinusoidal del hepatocito fusionándose con ella para luego ser secretadas por pinocitosis inversa a la circulación como moléculas de VLDL nacientes ricas en TG, que además poseen fosfolípidos, colesterol libre y esterificado y algo de Apo E y Apo C. Las VLDL nacientes para poder ser delipidadas requieren captar más Apo E y Apo C de las lipoproteínas de alta densidad (HDL, por sus siglas en inglés) y así transformarse en VLDL maduras. Durante el camino de su degradación, la VLDL nunca pierde la Apo B100 y la hidrólisis progresiva de sus TG conduce a una cascada de partículas esféricas cada vez más pequeñas (lipoproteínas de densidad intermedia (IDL, por sus siglas en inglés) → lipoproteínas de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés)). Por su parte, los lípidos exógenos absorbidos en el intestino son secretados a circulación desde las células del epitelio intestinal como quilomicrones, los que son delipidados en forma similar a las VLDL (Figura 8).

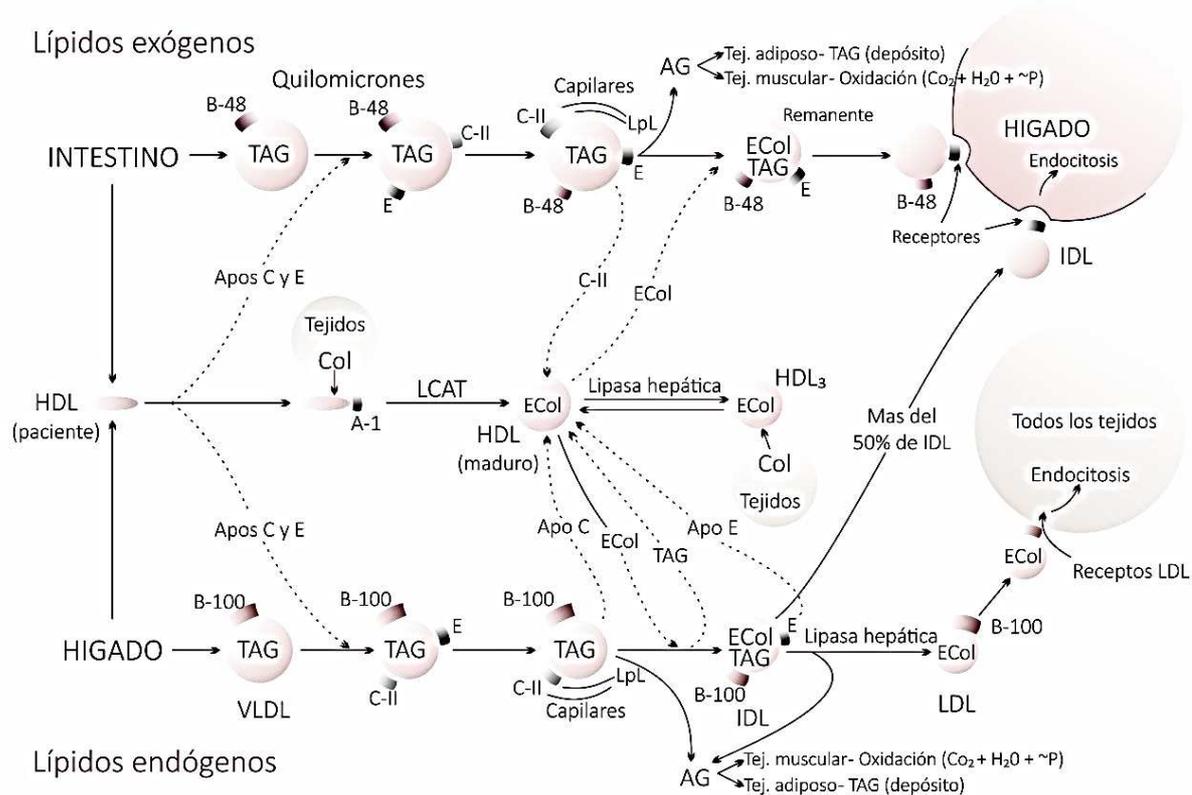


Figura 8. Metabolismo de las lipoproteínas del plasma. Blanco (2013).

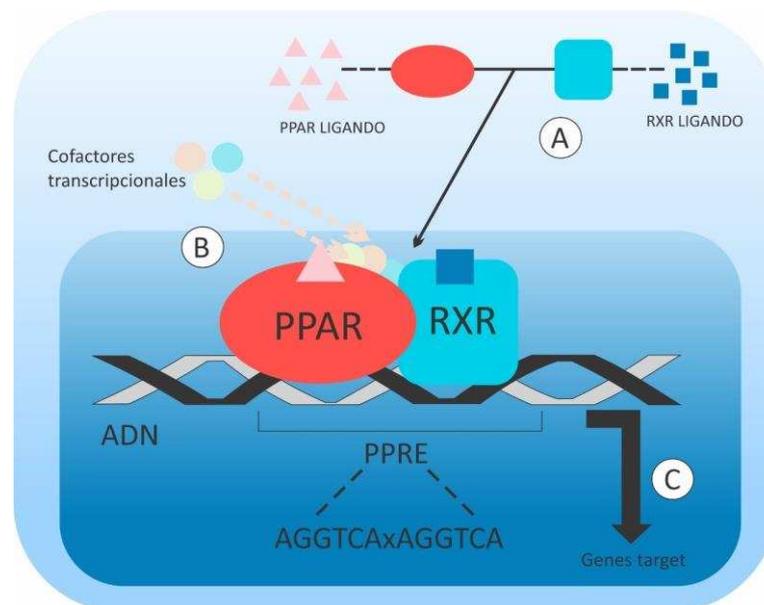
## II. 1. 6. Regulación del metabolismo lipídico

La regulación metabólica puede involucrar tres tipos de controles: el primero corresponde al control alostérico clásico, donde se activa una determinada enzima por la unión de un activador; el segundo involucra una serie de modificaciones que pueden sufrir las enzimas tales como: proteólisis, fosforilación, glucosilación, etc., pudiendo variar el equilibrio entre la enzima activa e inactiva o afectar la estabilidad de la proteína; y el tercero comprende la regulación transcripcional que afecta los niveles de expresión de las enzimas, pudiendo afectar el control de la homeostasis metabólica. Este último tipo de control requiere señales específicas que lleguen al núcleo celular y que definan los genes que deben ser transcritos y luego traducidos. En general, estas señales son generadas por receptores nucleares, que una vez activados, actúan como factores de transcripción. Por lo tanto, estos receptores nucleares se caracterizan por tener dos propiedades importantes: a) son activados luego de su unión con ligandos específicos, y b) se unen a elementos de respuesta localizados en las cercanías de los promotores de genes en los cuales actuarán. Uno de los principales receptores involucrados en la homeostasis lipídica en el hígado es el receptor alfa activador de la proliferación peroxisomal (PPAR $\alpha$ ).

### 3.1.6.1. Receptores activadores de la proliferación peroxisomal (PPAR)

Los receptores activadores de la proliferación peroxisomal (PPAR, por sus siglas en inglés), son miembros de la superfamilia de receptores nucleares, formando ellos mismos a su vez una familia con tres isoformas: PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , and PPAR $\beta/\delta$ . Se ha estudiado ampliamente la importancia de estos receptores como reguladores de la homeostasis energética y la función metabólica, teniendo implicancias demostradas en la dislipidemia, diabetes, diferenciación de adipocitos, inflamación, cáncer, enfermedades pulmonares, trastornos neurodegenerativos, fertilidad o reproducción, dolor y obesidad (Tyagi *et al.*, 2011).

La activación de los PPAR conduce a la formación de heterodímeros con los receptores retinoides X (RXR). Los complejos moleculares PPAR/RXR se unen a secuencias específicas del ADN, conocidas como elementos de respuesta a los proliferadores de peroxisomas, dando lugar a la estimulación o a la disminución de la respuesta de los genes correspondientes. La distribución tisular de las tres isoformas de PPAR les confiere selectividad funcional específica y diversos grados de sensibilidad frente a los ligandos y coactivadores que intervienen en el proceso de activación génica como resultado de su estimulación (Figura 9).



**Figura 9.** Activación transcripcional de PPAR. Adaptado de Rigano *et al.* (2017).

El PPAR $\alpha$  es la isoforma que se encuentra altamente expresado en el hígado y está involucrado en la regulación genética del metabolismo lipídico (Tyagi *et al.*, 2011; Bionaz *et al.*, 2013). Los fibratos (tales como el clofibrato y el WY14643, utilizados en el tratamiento de dislipemias) son activadores potentes del PPAR $\alpha$  (Grygiel-Górniak, 2014). Por otro lado, los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, por sus siglas en inglés) son ligandos naturales de los

PPAR, en general los ácidos grasos de las familias n-3 y n-6 tienen la capacidad de activarlos y ejercer sus efectos sobre la expresión de un gran número de genes que codifican enzimas, entre ellas: ACOX1 y CPT1 (Hein *et al.*, 2010; Bionaz *et al.*, 2013).

### **II. 1. 7. Metabolismo de ácidos grasos y otros lípidos durante el periodo de transición**

Indudablemente, el incremento de la demanda energética junto a la restricción en el CMS concomitante, supone unos de los principales desafíos de la vaca lechera durante el PT. Cuando la misma no puede adaptarse, surgen los problemas ampliamente descritos como cetosis e hígado graso. En este sentido, los AGNE y el BHB se han utilizado para cuantificar el BEN, cuantificar las pérdidas productivas y evaluar diferentes herramientas para la prevención de estas patologías (Ospina *et al.*, 2010a, 2013; Bicalho *et al.*, 2017). En este contexto, dada la importancia ya descrita del hígado, varios estudios han analizado biomarcadores sanguíneos relacionados con la funcionalidad hepática y que resultan útiles para analizar la salud animal (Bionaz *et al.*, 2007; Cozzi *et al.*, 2011). Sin embargo, dado que estos resultados por sí solos no son concluyentes para comprender las alteraciones metabólicas que se producen durante el periparto, otros investigadores han realizado estudios más complejos, como los genómicos y metabólicos (Drackley *et al.*, 2005; Graber *et al.*, 2012). En los últimos años, diversos grupos han evaluado la expresión de diferentes genes en el hígado (Loor *et al.*, 2005; Graber *et al.*, 2010) y otros tejidos (Steele *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015). Estos estudios han permitido mejorar el conocimiento de los mecanismos moleculares subyacentes a las adaptaciones metabólicas en vacas lecheras durante el periparto y han ayudado en el desarrollo de tecnologías interesantes para mejorar la salud de las vacas y la producción de leche (Loor *et al.*, 2006). Sin embargo, aunque estos estudios analizaron varios aspectos genómicos durante el periparto, no se han identificado elementos moleculares que desempeñen un papel central en las adaptaciones desde la gestación tardía hasta la lactancia temprana. Además, los datos sobre la expresión de proteínas en el hígado de las vacas lecheras durante el periparto son escasos.

A su vez, tales estudios se han llevado adelante en diferentes sistemas: intensivos con dietas totalmente mezcladas (TMR, por sus siglas en inglés) (Loor *et al.*, 2006) y sistemas pastoriles (Akbar *et al.*, 2015; Roche *et al.*, 2015). En Argentina y particularmente en la zona de influencia de la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV) de la Universidad Nacional del Litoral (UNL) predominan los sistemas intermedios, con vacas Holstein en pastoreo con mayor o menor suplementación, difíciles de ser encontrados en antecedentes bibliográficos.

De esta forma, el presente capítulo busca analizar los niveles de expresión génica y proteica de elementos claves implicados en el metabolismo de los ácidos grasos, como el

PPAR $\alpha$ , y de enzimas hepáticas relevantes relacionadas con el metabolismo de los ácidos grasos, como CPT1, ACOX1 y DGAT1, durante el PT, en relación con algunos parámetros plasmáticos y el contenido hepático de TG en un tambo comercial típico de la zona.

## II. 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### II. 2. 1. Procedimientos generales efectuados con animales

Todos los procedimientos efectuados en los animales se realizaron de acuerdo a las normativas vigentes en el tema (Guía para el cuidado y uso de animales agrícolas en Investigación y Docencia, Federación de Sociedades de Ciencia Animal, 2010), y fueron aprobados por el Comité de Ética y Seguridad Institucional de la FCV - UNL (Protocolo N° 158/2013).

### II. 2. 2. Animales

Para este estudio se seleccionaron ocho vacas Holstein multíparas, preñadas, secas, con una a tres lactancias, es decir, vacas que iban a comenzar luego del parto su segunda, tercera o cuarta lactancia. Los animales pertenecían a un establecimiento productor de leche comercial, ubicado en la zona rural de Hipatia, departamento Las Colonias, Provincia de Santa Fe. El estado de salud de los animales fue evaluado por un veterinario especialista del establecimiento. Entre otros aspectos, los signos externos evaluados fueron la temperatura rectal, el puntaje de CC, el color y la consistencia de las descargas vaginales, el aspecto general, la marcha y el estado de alerta. Además, se realizaron auscultación y percusión simultánea del abdomen. De este modo, se incluyeron en el estudio sólo vacas clínicamente sanas.

### II. 2. 3. Alimentación

El tambo comercial en el cual fue llevado a cabo el estudio poseía una alimentación de base pastoril con suplementación que resulta común en la cuenca lechera central Argentina. De esta forma, la dieta de la vaca lactante consistió en una dieta mixta compuesta de 17% de ensilado de maíz, 30% de grano de maíz craqueado y 4% de ensilaje de maíz de soja, 5% de harina de soja, 4% de semilla de soja sobre una base de materia seca (MS); con una mezcla mineral y vitamínica formulada para el establecimiento. El resto de la dieta se estimó como el 40% de la MS y se basó en el pastoreo de alfalfa *ad libitum*. La composición de la dieta fue: 16% proteína cruda (PC), 32% FDN, 19% fibra detergente ácida (FDA), 45% carbohidratos no fibrosos (CNF), 1,65 Mcal/kg de ENL, con un CMS estimado de 17 kg/día durante el periodo evaluado, desde el parto hasta los 60 días en lactancia. Por su parte, la dieta preparto consistió en 32% de ensilaje de maíz, 16% de paja de trigo, 16% de grano de maíz craqueado, 11% de harina de soja y 25% de heno de gramíneas en base a MS con un paquete de vitaminas y minerales que incluía sales aniónicas. La composición de la dieta fue: 14% PC, 45,1% FDN, 27% FCA, 36,8% CNF, 1,53 Mcal/kg de ENL; con un CMS estimado de 12 kg/día.

### II. 2. 4. Toma de muestras

Las muestras se recolectaron al inicio y al final del PT y en el pico de la lactancia, es decir en los días 28 ( $\pm 3$ ) y 14 ( $\pm 3$ ) previos a la fecha estimada de parto y en los días 4 ( $\pm 3$ ), 14 ( $\pm 3$ ), 28 ( $\pm 3$ ) y 56 ( $\pm 3$ ) postparto.

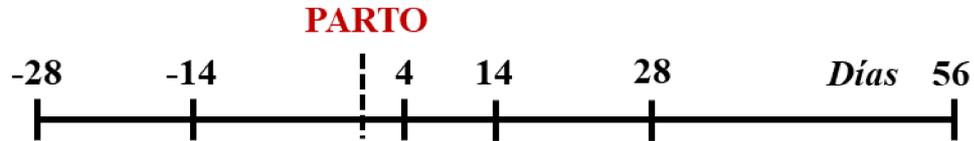


Figura 10. Diagrama de muestreos ensayo I.

#### II. 2. 4. 1. Obtención de plasma

Se extrajeron muestras de sangre de la vena yugular entre las 14 h y las 18 h, después del ordeño (a la misma hora se tomaron las muestras de las vacas secas, previo al parto) y se colocaron inmediatamente en tubos con EDTA tri-potásico y se enfriaron a 5°C. Los tubos se centrifugaron durante 10 min a 2000 g para separar el plasma para la determinación de metabolitos y hormonas y luego se almacenaron en ultrafreezer a -80°C hasta su análisis.

#### II. 2. 4. 2. Extracción de biopsias hepáticas

Las biopsias de hígado se obtuvieron en simultáneo con las muestras de sangre. Se realizó una incisión en la piel, bajo anestesia local con lidocaína al 2%, en el undécimo espacio intercostal derecho a nivel del trocánter mayor del fémur. Se insertó una aguja de biopsia percutánea, descrita por Buckley (1986) y modificada *ad hoc*, a través de la incisión, dirigiendo la aguja hacia el olecranon del cúbito del miembro izquierdo, y guiándose por ecografía, se profundizó hasta alcanzar el hígado perforando la cápsula del mismo. Se recogieron y fraccionaron aproximadamente 500 mg de tejido hepático en dos tubos destinados a diferentes técnicas. Las muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

### II. 2. 5. Procesamiento de muestras

Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada (LBCMA) del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral), Universidad Nacional del Litoral (UNL) - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), en la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNL).

### II. 2. 5. 1. Determinación de metabolitos plasmáticos y mediciones hormonales

Los niveles de BHB se midieron en sangre total utilizando tiras reactivas (FreeStyle Optium Xceed, Abbott Diabetes Care Ltd., Oxon, Reino Unido). Por otro lado, las concentraciones plasmáticas de AGNE, glucosa, TG, proteína total, albúmina, AST, GGT, bilirrubina total (BiT), bilirrubina indirecta (BiI), bilirrubina directa (BiD) y FA, se determinaron utilizando kits colorimétricos comerciales (Tabla 2) y un espectrómetro UV/Vis ultrarrápido SPECTROstar Nano (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Alemania).

**Tabla 2.** Determinaciones plasmáticas y kits comerciales utilizados

<b>Determinación</b>	<b>Proveedor</b>	<b>Catálogo Número</b>
<b>AGNE</b>	RANDOX Laboratories LTD (Reino Unido)	FA 115
<b>Glucosa</b>		1400101
<b>TG</b>		1780107
<b>Proteína total</b>		1690001
<b>Albúmina</b>		
<b>AST</b>	WIENER Lab (Rosario, Argentina)	1751351
<b>GGT,</b>		1761351
<b>BiT</b>		
<b>BiI</b>		1120001
<b>BiD</b>		
<b>FA</b>		1361003

Los niveles plasmáticos de insulina se midieron mediante radioinmunoensayo (RIA) en el Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME, CONICET, Buenos Aires). Para tal fin se utilizó un anticuerpo de insulina anti-bovina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) y un estándar de insulina humana proporcionado por Laboratorios Beta (Buenos Aires, Argentina). La concentración mínima detectable fue de 0,05 ng/ml. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron siempre inferiores al 8% y 11%, respectivamente (Becú-Villalobos *et al.*, 2007).

### II. 2. 5. 2. Análisis del contenido de TG hepáticos

Los lípidos totales se extrajeron de homogeneizados de hígado de acuerdo con el procedimiento de Folch *et al.* (1957). Los lípidos totales de la muestra (incluidos TG, colesterol

y fosfolípidos) se extrajeron con una mezcla de cloroformo/metanol (2:1 v/v). Luego, el extracto se filtró y se lavó con soluciones adecuadas de sales y solventes (primero con  $\text{CaCl}_2$  al 0,02% en una mezcla de cloroformo/metanol/ $\text{H}_2\text{O}$  (3:48:47 v/v/v), y luego en la misma mezcla sin  $\text{CaCl}_2$  para extraer las sustancias no lipídicas y los vestigios del agua. Finalmente, los fosfolípidos se eliminaron por adsorción con ácido silícico y los TG se resuspendieron en isopropanol para ser cuantificado espectrofotométricamente utilizando un kit enzimático comercial (kit número 1780107, Laboratorio WIENER, Rosario, Argentina).

### *II. 2. 5. 3. Procesamiento de las muestras para el análisis mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)*

#### II. 2. 5. 3. 1. Extracción de ARN total

Para la obtención del ARN total a partir del tejido hepático, se pesaron aproximadamente 20 mg de tejido congelado, se agregaron 750  $\mu\text{l}$  del reactivo TRIzol<sup>®</sup> LS Reagent (Invitrogen) y luego se procedió a la homogeneización del tejido con un homogeneizador manual (Ultra Turrax<sup>®</sup> IKA T10 Basic) hasta lograr la disgregación total del mismo. A continuación, la suspensión fue incubada durante 5 min a temperatura ambiente y luego se agregaron 200  $\mu\text{l}$  de cloroformo, agitando vigorosamente para favorecer el contacto entre las fases. La mezcla resultante fue incubada durante 10 min entre 4 - 8 °C, para luego centrifugarse a 12000 g durante 20 min a 4 °C y permitir la diferenciación de las fases. La fase acuosa fue trasvasada a un tubo estéril, se adicionó igual volumen de isopropanol, y se incubó toda la noche a -20 °C para favorecer la precipitación de los ácidos nucleicos de interés. Posteriormente, se centrifugó a 12000 g durante 20 min a 4 °C. El precipitado obtenido, correspondiente al ARN total, fue finalmente resuspendido y alicuotado en agua DEPC precalentada a 60 °C y libre de ARNasas.

#### II. 2. 5. 3. 2. Transcripción reversa

Para eliminar posibles contaminaciones del ARN con ADN genómico, se realizó un tratamiento con ADNasa. Para ello, una mezcla de 3  $\mu\text{l}$  de buffer DNase (10 X, Invitrogen), 3  $\mu\text{l}$  de la enzima DNase (40 U/ $\mu\text{l}$ , Invitrogen), una cantidad constante de ARN (3 $\mu\text{g}$ ) y agua DEPC csp 30  $\mu\text{l}$ ; fueron incubados durante 15 min a 20 °C. Posteriormente se inactivó la enzima ADNasa con la incorporación 6  $\mu\text{l}$  de una solución de EDTA 25 mmol/l incubando a 65 °C durante 15 min.

Posteriormente las cadenas de ADN copia (ADNc) fueron sintetizadas usando una concentración final de la mezcla de reacción conteniendo: MMLV (del inglés: *Moloney Murine Leukemia Virus*) buffer 1X, dithiothreitol (DTT, 10 mmol/l), inhibidor de ribonucleasas (1 U/ $\mu\text{l}$ ,

RNaseOUT), retrotranscriptasa (MMLV, 10 U), desoxiribonucleótidos trifosfatos (0,5 mmol/l, dNTP), cebadores con secuencia al azar (0,0125 µg/µl). Se utilizó para ello una cantidad constante de ARN (3µg), luego del tratamiento ADNasa, y fueron utilizadas las siguientes condiciones para la transcripción reversa: 10 min a 25 °C para el anillado, 50 min a 37 °C para la síntesis del ADNc y 15 min a 70 °C para la inactivación de la ADNasa. Todas las reacciones se llevaron a cabo para un volumen final de 60 µl utilizando un termociclador estándar (TC-3000G, Techne Inc., NJ, USA). El producto de la reacción, ADNc simple cadena, se almacenó a -20 °C hasta su uso.

#### II. 2. 5. 3. 3. Diseño de cebadores específicos

Los cebadores específicos para las secuencias correspondientes a *CPT1*, *ACOXI*, *DGATI*, y los genes evaluados de control interno: beta-actina, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) y ubiquitina (*UBQ*); fueron diseñados utilizando el programa PRIMER SELECT versión 7 (Lasergene, DNA STAR, USA), y contrastados on-line empleando la página Integrated DNA Technologies [<http://www.idtdna.com/site>] y la herramienta de diseño propuesta en Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), Primer designing tool [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>]. Cada par de cebadores fue obtenido a partir de la secuencia genómica de los genes en estudio publicado en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>] (Tabla 3). Para su diseño, se tuvo en cuenta el tamaño del amplicón, la ubicación de cada cebador en la hebra molde, la secuencia, la temperatura de hibridación o temperatura de annealing ( $T_a$ ), el porcentaje de citosina y guanósina (% CG) y la formación de heterodímeros, homodímeros y hairpins. La especificidad de los productos de la PCR se confirmó mediante la secuenciación del ADN mediante el uso del Servicio de secuenciación de macrógenos (Macrogen, Seúl, Corea).

#### II. 2. 5. 3. 4. Amplificación mediante RT-PCR

Se utilizó un protocolo de RT-PCR optimizado para analizar la expresión del ARN mensajero (ARNm) de *CPT1A*, *ACOXI* y *DGATI* en tejido hepático utilizando la tecnología SYBR Green I (Invitrogen) en un LightCycler. Previamente, se evaluaron la *GAPDH*, la  $\beta$ -actina y la *UBQ* para seleccionar el mejor control interno. La selección se basó en el análisis de los coeficientes de variación (CV) del ciclo de umbral ( $C_t$ , por sus siglas en inglés) entre los grupos, eligiendo a la *UBQ* como el control interno apropiado.

Cada reacción de RT-PCR se realizó en un volumen total de 20  $\mu\text{l}$  que contenía 4  $\mu\text{l}$  de ADNc (500 ng/ml), 4  $\mu\text{l}$  de buffer de reacción Phire 5X, 0,5  $\mu\text{l}$  de cada 10 mmol/l de cebadores, 0,2 mmol/l dNTPs, 1  $\mu\text{l}$  SYBR Green I (Invitrogen), 0,05  $\mu\text{l}$  Phire Taq polimerasa (Thermo Fisher Scientific Company, Finlandia) y 14  $\mu\text{l}$  de agua tratada con DEPC estéril.

Los niveles relativos de transcritos se midieron en el termociclador StepOne Real Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technology, CA, USA) y se analizaron mediante el método de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak y Schmittgen, 2001). El programa utilizado incluyó un tiempo inicial de desnaturalización de 3 min a 98 °C, seguido de 40 ciclos de: 5 segundos a 98 °C para la desnaturalización del ADNc, 20 segundos de anillado a las temperaturas detalladas en la Tabla 3 y 25 segundos a 72 °C para la extensión. Un último paso a 72 °C durante 10 min fue necesario para la extensión final de todos los productos amplificados.

La eficiencia de las PCR y las cantidades relativas de los productos de la PCR se determinaron a partir de curvas estándar, que se construyeron a partir de una serie de dilución de ADNc combinado (incluidas once diluciones de 1/10 a 1/10240), y la eficiencia de la PCR se calculó utilizando el StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems). Las reacciones con un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) superior a 0,98 y una eficiencia entre 95 y 105 % se consideraron optimizadas. Además, todos los productos de la RT-PCR se ejecutaron inicialmente en geles de agarosa para verificar los tamaños del producto.

**Tabla 3.** Secuencias de cebadores, regiones de los genes diana, y longitud del producto y de temperatura de hibridación, utilizadas para la RT-PCR semicuantitativa de tejidos bovinos.

Cebador	Secuencia (5' → 3')	N° acceso NCI	Tamaño amplicón (pb)	T (°C)
<i>Bv-ACOXI</i>	F: TGGCGGACATGGCTATTCTCAC R: TGGCTGGGCAGGTCATTCAAG	NM_001035289.3	195	56,8
<i>Bv-CPT1A</i>	F: GATTTCCTACTCCTTCCCATTC R: GGCTCCGTTCTGCCCTCTC	NM_001204989	180	56,4
<i>Bv-DGAT1</i>	F: GCCAGGACGGCAGTGTCTTCT R: GGCTGCCCCGATGATGAGTG	NM_174693	191	60,2
<i>Bv-UBQ</i>	F: AGATCCAGGATAAGGAAGGCAT R: GCTCCACCTCCAGGGTGAT	XM_005195028.3	198	60,0
<i>Bv-<math>\beta</math>-actina</i>	F: CGGAACCGCTCATTGCC R: ACCCACACTGTGCCCATCTA	AY141970.1	290	52,0
<i>Bv-GAPDH</i>	F: CACCCTCAAGATTGTCAGCA R: GGCATAAGTCCCTCCACGA	NM_001034034	103	56,0

Bv: bovino; F: forward; R: reverse; pb: pares de bases.

Todas las mediciones para cada muestra se realizaron por duplicado y los CV se calcularon según lo descrito por Bustin *et al.* (2009); el Ct se calculó utilizando el software StepOne v2.3 (Applied Biosystems) con un ajuste manual de umbral de fluorescencia. Se incluyeron controles negativos sin ADN en todos los ensayos para corroborar la ausencia de amplificación consistente.

#### II. 2. 5. 4. Evaluación de la expresión proteica

##### II. 2. 5. 4. 1. Homogeneizado de las muestras

Se tomaron fracciones de 20 mg de tejido hepático aproximadamente, que fueron colocadas en buffer de lisis que consistía en 1 % v/v IGEPAL CA630 (octilfenil-poliethylenglicol), 0,1 % p/v SDS, 0,5 % p/v desoxicolato de sodio, 50 mmol/l de fluoruro de sodio, 1 mmol/l de EDTA (todos de Sigma-Aldrich Corp., Darmstadt, Alemania), 0,1 mol/l de PBS y un inhibidor de proteasa (cOmplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail, Roche, Mannheim, Alemania). Luego fueron homogeneizadas con un homogeneizador de mano (Ultra Turrax®, IKA®), y se obtuvo el sobrenadante luego de centrifugar las muestras a 14000 g en una centrífuga refrigerada durante 20 min. Una vez obtenidos los extractos de proteínas se determinó la concentración proteica de cada muestra mediante el método colorimétrico (DC Protein Assay, Bio-Rad, Nueva York, Estados Unidos), para su posterior conservación a -80 °C.

##### II. 2. 5. 4. 2. Análisis mediante Western blot

La electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) se realizaron con un tamaño del poro para el gel de resolución en relación a una concentración de acrilamida del 10%, por el peso molecular de las proteínas a determinar. Se prepararon las muestras obtenidas por homogeneización, diluyendo convenientemente con buffer de muestra en condiciones reductoras para la SDS-PAGE, y posteriormente se incubaron en baño termostático en ebullición durante 5 min. Según los valores obtenidos de la cuantificación, se sembraron 60 µg de proteína/línea para PPARα, 60 µg para CPT1, 40 µg para ACOX1 y 40 µg para DGAT1. Se realizó la electroforesis en una cuba vertical y utilizando el buffer de corrida Tris-Glicina con 0,1 % de SDS, pH 8,3. Luego, se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) utilizando buffer de transferencia Towbin modificado (Tris-Glicina y 20 % de metanol). Las membranas obtenidas se colorearon con el colorante Rojo Ponceau para comprobar la efectividad de la transferencia, luego se lavaron con agua destilada para eliminar

el colorante y se almacenaron a 4 °C hasta el momento de la inmunodetección de las proteínas detalladas en la Tabla 4.

Para la inmunodetección de las proteínas en las membranas de nitrocelulosa, los sitios de unión inespecíficos fueron bloqueados con TBS-T leche al 5 % durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación. Luego se llevó a cabo la incubación con el anticuerpo primario (Tabla 4) durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, la incubación con el anticuerpo secundario (Tabla 4) se llevó a cabo durante 1,5 h a temperatura ambiente en agitación. Para la dilución, tanto del anticuerpo primario como del secundario, se utilizó TBS-T leche al 0,5%. Finalmente se llevó a cabo una incubación con reactivo quimioluminiscente (ECL Plus, GE Healthcare) durante 5 min, e inmediatamente una exposición de la membrana en placas radiográficas (GE Healthcare) en cuarto oscuro y revelado de las mismas con los reactivos de revelado y fijado (Kodak).

Las placas radiográficas se escanearon a 600 ppp (escáner HP Office jet J5, 780; Hewlett Packard) y los niveles de proteínas se analizaron por densitometría para obtener un valor de densidad óptica integrada. La intensidad de las bandas se cuantificó utilizando el sistema IMAGE PROPLUS 3.0.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MA, EE. UU.).

Como control interno se utilizó la proteína constitutiva  $\beta$ -actina utilizando el mismo protocolo que el descrito anteriormente y un anticuerpo conjugado con peroxidasa IgG goat anti-mouse (Tabla 4). Por otro lado, en cada gel se sembró una muestra de un pool de tejido hepático control para ajustar los valores de las bandas de diferentes membranas. Se evaluó el rango lineal de intensidad de la señal midiendo la quimioluminiscencia al aumentar los tiempos de exposición.

La especificidad de los anticuerpos utilizados ha sido demostrada tanto *in vivo* como *in vitro* por sus proveedores. Además, la homología entre el péptido diana de cada anticuerpo y la proteína bovina correspondiente se probó utilizando herramientas en la Búsqueda de Alineación Local Básica (software BLAST; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para determinar las ubicaciones de péptidos y para confirmar la especificidad del antígeno.

**Tabla 4.** Anticuerpos y condiciones utilizados en la técnica de Western blot.

<b>Anticuerpo</b>	<b>Tipo</b>	<b>Proveedor</b>	<b>Dilución</b>
<i>Anticuerpo primario</i>			
<b>PPAR</b>	Rabbit Polyclonal H-98: sc-9000	Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA	1/250
<b>CPT1-L</b>	Rabbit Polyclonal H-95:sc-20669	Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA	1/400
<b>ACOX1</b>	Rabbit Polyclonal H-140: sc-98499,	Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA	1/500
<b>DGAT1</b>	Rabbit Polyclonal ab54037	Abcam, Cambridge, UK	1/1000
<b><math>\beta</math>-actina</b>	Mouse monoclonal JLA20	DSHB, Iowa City, IA, USA	1/1500
<i>Anticuerpo secundario</i>			
<b>Mouse anti-rabbit IgG</b>	Polyclonal sc-2357	Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA	1/10000
<b>Goat anti-mouse IgG</b>	Monoclonal sc-2005	Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA	1/10000

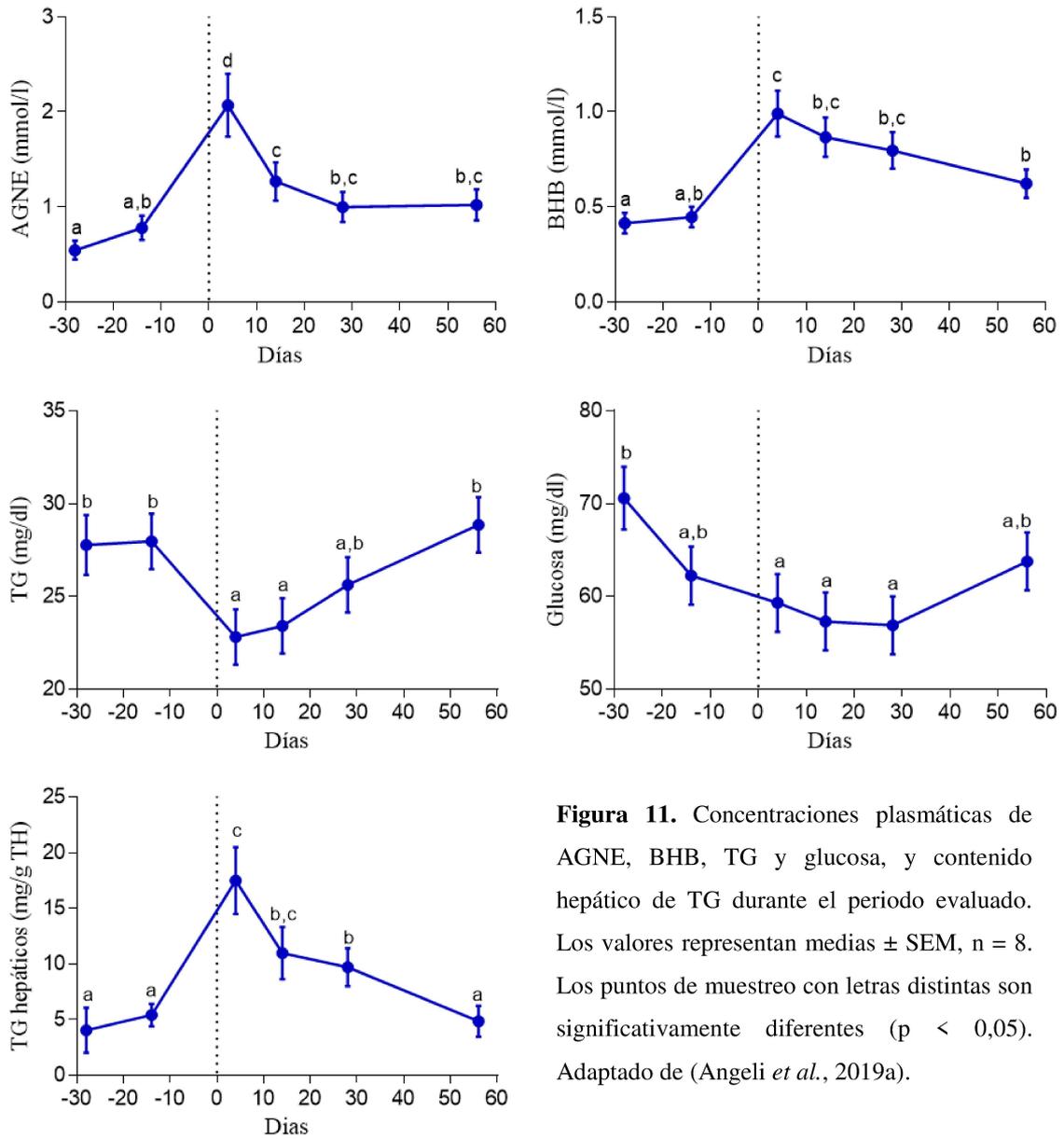
## II. 2. 6. Análisis estadístico

Los diferentes parámetros cuantificados fueron evaluados con el programa SPSS 22.0.0 para Windows (Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). La normalidad se verificó por el test de Kolmogorov-Smirnov. Dado que gran parte de las variables en el estudio no presentaron distribución normal, las diferencias estadísticas entre los grupos se analizaron con modelos lineales generalizados (MLG). En los mismos se utilizó la función de enlace lineal para variables normales y gamma para variables con sesgo a la derecha. El nivel de significancia utilizado fue  $p < 0,05$  en todos los casos. Los valores se expresaron como el promedio  $\pm$  el error estándar de la media (SEM).

## II. 3. RESULTADOS

### II. 3. 1. Condición corporal, parámetros metabólicos plasmáticos y contenido de triglicéridos en el hígado

La CC disminuyó desde el parto hasta el día 4 después del mismo ( $p < 0,05$ ) y luego permaneció sin diferencias hasta el día 56 (Tabla 5). Las concentraciones plasmáticas de AGNE y BHB aumentaron entre el parto y el día 4 posterior ( $p < 0,05$ ). Los AGNE presentaron un pico alrededor del día 4 posterior al parto, disminuyendo luego ( $p < 0,05$ ), el BHB se mantuvo elevado hasta el día 28 posterior al parto ( $p > 0,05$ ). La concentración plasmática de TG disminuyó entre el día 14 preparto y el día 4 postparto y luego aumentó gradualmente hasta el día 56 postparto ( $p < 0,05$ ). La concentración plasmática de glucosa disminuyó entre el día 28 preparto y el día 28 postparto ( $p < 0,05$ ). El contenido de TG en el hígado fue significativamente mayor en los días 4 y 14 posteriores al parto y luego disminuyó en el día 28 posterior al parto, volviendo a los valores preparto en el día 56 postparto (Figura 11). Las concentraciones de insulina y proteína total no mostraron diferencias durante todo el período evaluado ( $p > 0,05$ ). En contraste, la concentración de albúmina aumentó desde el día 4 postparto hasta el día 56 postparto ( $p < 0,05$ ). Si bien la actividad de AST no cambió significativamente, la actividad de GGT aumentó después del parto y se mantuvo constante ( $p < 0,05$ ). Las concentraciones de bilirrubina (total, directa e indirecta) y la actividad de ALP no mostraron diferencias durante todo el período evaluado ( $p > 0,05$ ) (Tabla 5).



**Figura 11.** Concentraciones plasmáticas de AGNE, BHB, TG y glucosa, y contenido hepático de TG durante el periodo evaluado. Los valores representan medias  $\pm$  SEM, n = 8. Los puntos de muestreo con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Adaptado de (Angeli *et al.*, 2019a).

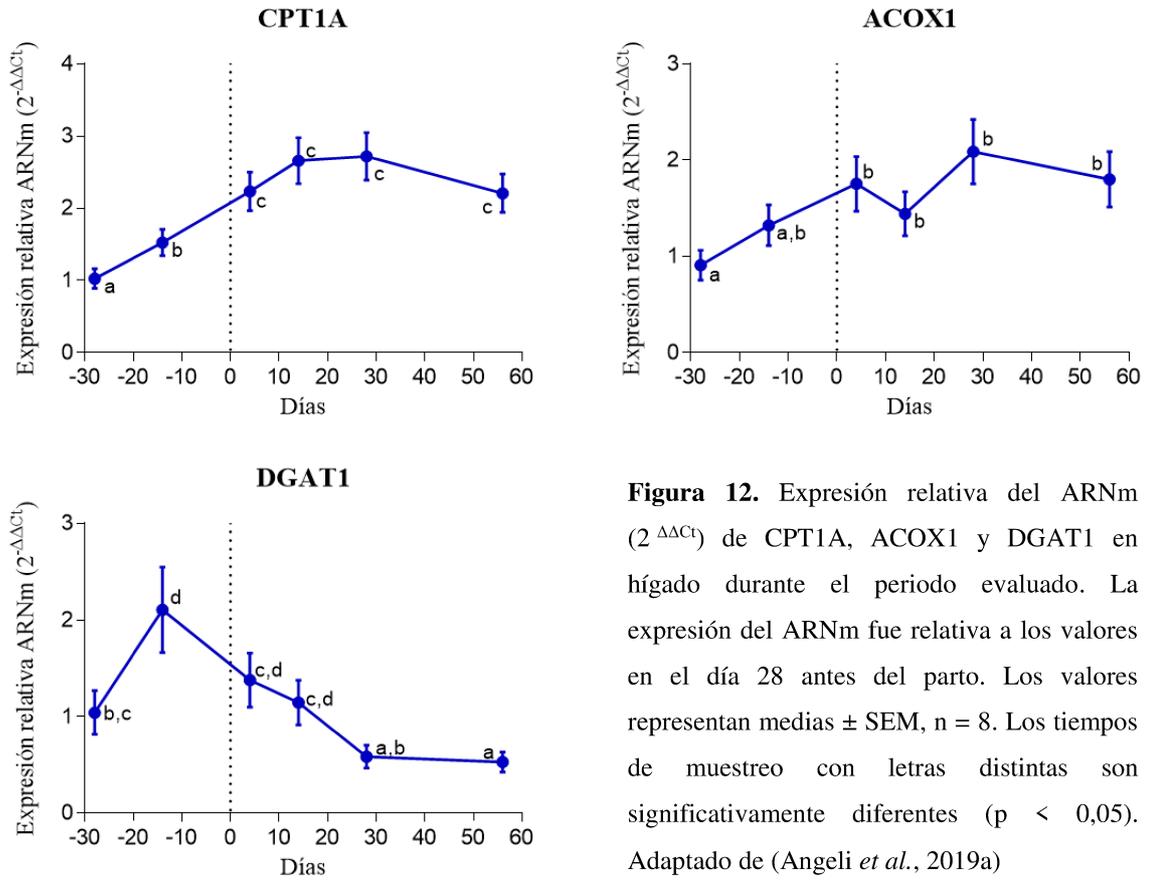
**Tabla 5.** Concentraciones de insulina, proteína, albúmina, BilT, BilD, BilI y actividad de AST, GGT y FA en plasma a lo largo del periodo evaluado.

Días	Preparto			Postparto			
	28	14	4	14	28	56	
<b>Insulina</b> (ng/ml)	0,70 ± 0,12	0,76 ± 0,11	0,47 ± 0,11	0,62 ± 0,11	0,34 ± 0,11	0,55 ± 0,11	p > 0,05
<b>Proteína</b> (g/dl)	7,16 ± 0,24	7,29 ± 0,22	6,81 ± 0,22	7,42 ± 0,22	7,22 ± 0,22	7,24 ± 0,22	p > 0,05
<b>Albúmina</b> (g/dl)	2,91 ± 0,11 <sup>ab</sup>	3,05 ± 0,10 <sup>ab</sup>	2,82 ± 0,10 <sup>a</sup>	2,92 ± 0,10 <sup>ab</sup>	3,12 ± 0,10 <sup>bc</sup>	3,36 ± 0,10 <sup>c</sup>	p < 0,01
<b>AST</b> (UI/l)	111,22 ± 12,07	105,94 ± 10,52	110,72 ± 10,96	130,63 ± 14,05	125,89 ± 12,50	151,81 ± 15,15	p > 0,05
<b>GGT</b> (UI/l)	22,31 ± 1,08 <sup>ab</sup>	20,70 ± 1,00 <sup>a</sup>	24,27 ± 1,00 <sup>b</sup>	24,95 ± 1,00 <sup>b</sup>	23,96 ± 1,00 <sup>b</sup>	23,38 ± 1,00 <sup>ab</sup>	p = 0,40
<b>BilT</b> (mg/dl)	1,47 ± 0,10	1,25 ± 0,09	1,56 ± 0,09	1,31 ± 0,09	1,32 ± 0,09	1,56 ± 0,09	p > 0,05
<b>BilD</b> (mg/dl)	0,08 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,08 ± 0,02	p > 0,05
<b>BilI</b> (mg/dl)	1,39 ± 0,10	1,16 ± 0,09	1,42 ± 0,09	1,24 ± 0,09	1,23 ± 0,09	1,47 ± 0,09	p > 0,05
<b>FA</b> (UI/l)	36,91 ± 3,28	31,80 ± 2,62	29,45 ± 2,42	34,47 ± 2,83	32,12 ± 2,64	33,77 ± 2,77	p > 0,05

Los valores se expresan como media ± SEM. En cada uno de los parámetros, los valores de cada tiempo de muestreo que no comparten la misma letra superíndice son significativamente diferentes (p < 0,05). Adaptado de (Angeli *et al.*, 2019a)

### II. 3. 2. Expresión génica de *CPT1A*, *ACOX1* y *DGAT1*

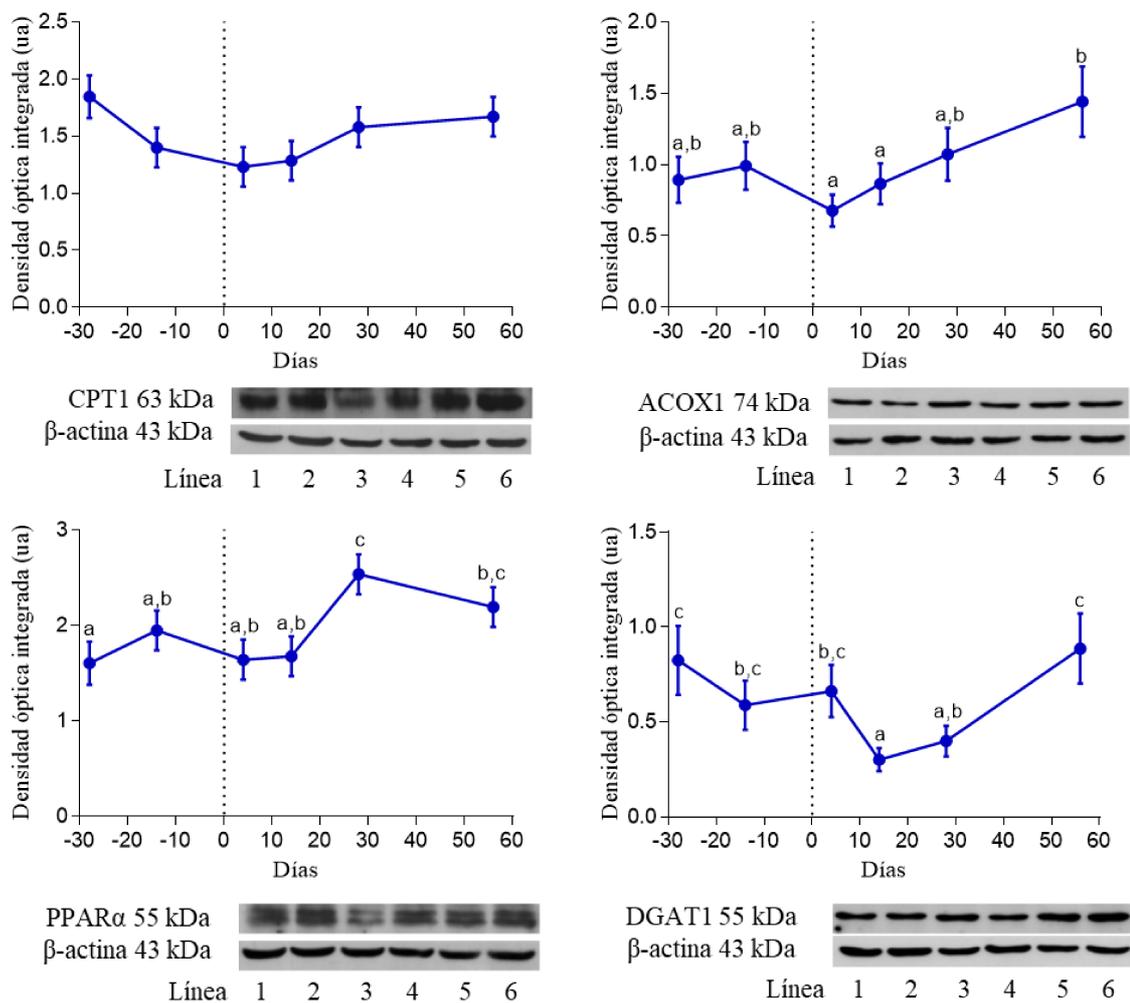
Mientras que la expresión del ARNm de *CPT1A* aumentó significativamente desde el día 28 antes del parto hasta el día 4 después del parto y luego se mantuvo sin cambios hasta el día 56 después del parto, la expresión del ARNm de *ACOX1* aumentó con un pico en el día 28 después del parto (p < 0,05). Por otro lado, la expresión de ARNm de *DGAT1* aumentó desde el día 28 hasta el día 14 antes del parto, y luego disminuyó desde los días 14 antes del parto hasta el día 28 después del parto (p < 0,05). (Figura 12).



**Figura 12.** Expresión relativa del ARNm ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) de CPT1A, ACOX1 y DGAT1 en hígado durante el periodo evaluado. La expresión del ARNm fue relativa a los valores en el día 28 antes del parto. Los valores representan medias  $\pm$  SEM,  $n = 8$ . Los tiempos de muestreo con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Adaptado de (Angeli *et al.*, 2019a)

### II. 3. 3. Expresión proteica de CPT1, ACOX1, PPAR $\alpha$ y DGAT1

Mientras que la expresión de la proteína CPT1 no cambió durante todo el período evaluado ( $p > 0,05$ ), la expresión de la proteína ACOX1 tampoco cambió significativamente en los días 28 y 14 antes del parto y en 4 postparto, pero aumentó desde el día 4 hasta 56 después del parto ( $p < 0,05$ ). La expresión de la proteína PPAR $\alpha$  en los días 28 y 14 antes del parto y en los días 4 y 14 después del parto fue similar ( $p > 0,05$ ), pero aumentó el día 28 después del parto ( $p < 0,05$ ). Por otro lado, la expresión de la proteína DGAT1 disminuyó en el día 14 después del parto ( $p < 0,05$ ) y luego volvió a los valores preparto (Figura 13).



**Figura 13** Expresión proteica de CPT1, ACOX1, PPAR $\alpha$  y DGAT1 durante el periodo evaluado.

Parte superior: Densidad óptica integrada (ua: unidades arbitrarias), determinada por Western blot. Los valores representan medias  $\pm$  SEM,  $n = 8$ . Los puntos de tiempo con letras diferentes son diferentes ( $p < 0,05$ ).

Parte inferior: inmunomarcación representativa. El peso molecular se indica a la derecha. Líneas 1 y 2: días 28 y 14 preparto; líneas 3 a 6: días 4, 14, 28 y 56 postparto. Adaptado de (Angeli *et al.*, 2019a)

## II. 4. DISCUSIÓN

Diferentes estudios han informado una relación entre el transcriptoma hepático y el metabolismo durante el parto de vaca lecheras (Loor *et al.*, 2005, 2006; Graber *et al.*, 2010; Akbar *et al.*, 2015). Sin embargo, los cambios en la expresión génica de enzimas claves, por sí sola no puede explicar los procesos que ocurren en el hígado (Mann *et al.*, 2018). Por lo tanto, en este primer estudio se analizó la expresión proteica de enzimas relevantes de una de las vías claves del metabolismo de los lípidos del hígado, en asociación con la expresión génica y con parámetros plasmáticos. Los valores de CC hallados se encontraron de acuerdo con estudios anteriores (Friggens *et al.*, 2004) y recomendaciones internacionales (Roche *et al.*, 2009). Habitualmente se buscaba una CC de 3,5 al parto para optimizar la producción de leche, sin embargo, se ha propuesto que no existen diferencias productivas evidentes entre vacas con 3,0 y 3,5 al parto, y por encima de ese valor aumenta el riesgo de sufrir enfermedades postparto (Roche *et al.*, 2009). En función de esta conclusión, se recomienda una CC al parto entre 3,0 - 3,25 y perder menos de 1 punto en la lactancia, registrándose los valores de las vacas de nuestro estudio dentro de dicho rango.

Respecto a las concentraciones plasmáticas de AGNE y BHB, se observó un incremento durante la primera semana postparto, similar a lo encontrado en trabajos previos con dietas TMR (Loor *et al.*, 2005; McCarthy *et al.*, 2015a) pero diferente a otros trabajos con rodeo pastoriles (van Dorland *et al.*, 2009; Akbar *et al.*, 2015), lo que podría indicar que la lipomovilización sugerida en los animales de nuestro estudio (vacas Holstein en pastoreo con suplementación) sería similar a la de sistemas más intensivos. Según lo descrito por otros autores, el momento posparto en el cual se produce el aumento en las concentraciones de AGNE y BHB es importante para un diagnóstico correcto de los problemas en el parto (Oetzel, 2004; LeBlanc, 2010). En relación a esto, se han sugerido dos clasificaciones para la cetosis con una etiología y, por lo tanto, una estrategia de prevención diferente. La cetosis tipo II es aquella que se da en las primeras semanas postparto, asociado a la presencia de hígado graso y de peor pronóstico que la cetosis tipo I. Esta última se suele dar en vacas en el pico de lactancia (4-6 semana) y subalimentadas (Herdt, 2000; LeBlanc, 2010). Si bien en nuestro caso no se observan valores compatibles con cetosis clínicas o subclínicas, el momento del aumento detectado se corresponde al aumento que se observa en cetosis tipo II.

Las concentraciones plasmáticas postparto de TG y glucosa registradas en nuestro estudio están de acuerdo con estudios previos de otros autores (Harrison *et al.*, 1990; Hammon *et al.*, 2009; van Dorland *et al.*, 2009; Lean *et al.*, 2013; Kessler *et al.*, 2014; Bicalho *et al.*, 2017). Bajas concentraciones plasmáticas de glucosa junto a mayores concentraciones

plasmáticas de BHB y mayor contenido de TG hepáticos, se han asociado con una mayor producción de leche. En este sentido, en el presente estudio detectamos un aumento en el contenido de TG hepáticos durante el postparto, en concordancia a los hallazgos de otros autores (Rukkwamsuk *et al.*, 2000; Loor *et al.*, 2005; Akbar *et al.*, 2015).

También cuantificamos biomarcadores relevantes relacionados con el daño en el tejido hepático y la función hepática. Mientras que la actividad GGT aumentó significativamente durante el postparto, las actividades de AST y ALP junto con la concentración plasmática de BilT no presentaron diferencias durante el período evaluado. Además, no encontramos una disminución en la concentración plasmática de albúmina inmediatamente después del parto, en concordancia con otros autores (Trevisi *et al.*, 2009). Otros estudios realizados por estos mismos autores no han demostrado una asociación entre los parámetros de daño tisular (AST y GGT) y otros parámetros relacionados con la función hepática (BilT y albúmina) en vacas después del parto (Bionaz *et al.*, 2007; Bertoni *et al.*, 2008). Por lo tanto, a pesar del aumento de GGT registrado en nuestro animales, las alteraciones en la función hepática descritas en estudios previos con dietas TMR y sistemas basados en pasturas (Cavestany *et al.*, 2005; Seifi *et al.*, 2007) no fueron evidentes en los animales de nuestro estudio.

De acuerdo al contexto previamente descrito, animales con valores de parámetros que caracterizan al BEN dentro de los rangos esperados y sin evidencia de trastornos hepáticos, se analizaron la expresión génica y proteica de algunos elementos claves de algunas vías del metabolismo de ácidos grasos en el hígado. Diversos investigadores se han centrado en estudios genómicos y, entre otros resultados notables, algunos han encontrado diferencias en la expresión génica de *DGATI* hepática con una dieta preparto de energía controlada, lo que explicaría la variación en la concentración de TG en el hígado (Loor *et al.*, 2006). En nuestro estudio, encontramos una disminución en la expresión génica de *DGATI*, particularmente en los días 28 y 56 postparto. De manera similar, la expresión de la proteína DGAT1 disminuyó durante el postparto hasta el día 14, aumentando posteriormente. La expresión de DGAT1 está bajo regulación transcripcional y postranscripcional en condiciones específicas, y su actividad también puede estar regulada por hormonas o estado nutricional (Yen *et al.*, 2008). En este sentido, los estudios con músculo de toros y con cultivos de adipocitos de rata han demostrado que la expresión de DGAT1 está regulada positivamente por la glucosa (Meegalla *et al.*, 2002; Sevane *et al.*, 2013). Además, se ha encontrado que los tratamientos con ácidos grasos de cadena larga aumentan la actividad de DGAT1 en hepatocitos de rata (Yen *et al.*, 2008). Por lo tanto, la baja concentración de glucosa plasmática podría explicar la menor expresión de DGAT1. Aunque la capacidad de los rumiantes para convertir los AGNE que ingresan al hígado

a TG es similar a la de las especies no rumiantes, el alto contenido de TG registrado en el hígado de nuestros animales podría deberse a que los rumiantes tienen una capacidad relativamente baja para la síntesis y secreción de VLDL (Kleppe *et al.*, 1988; Pullen *et al.*, 1990). Por lo tanto, esta última podría explicar el aumento del contenido de TG en el hígado registrado durante el postparto en los animales de nuestro estudio.

Como mencionamos anteriormente, el contenido de acil-CoA en los hepatocitos aumentaría a consecuencia del flujo masivo de AGNE al hígado luego del parto (LeBlanc, 2010). Por lo tanto, evaluamos la oxidación hepática de ácidos grasos en mitocondrias y peroxisomas. En este sentido, registramos un aumento significativo en la expresión génica de *CPT1A* inmediatamente después del parto, que se mantuvo constante con niveles altos durante todo el período de postparto evaluado. Además, la expresión génica de *ACOX1* aumentó después del parto. En los últimos años, varios estudios han analizado la expresión génica de diferentes enzimas en vacas lecheras durante el PT. La información no ha sido concluyente, pero existen estudios genómicos que han mostrado incrementos de genes relacionados con la oxidación de ácidos grasos en el postparto (Loor *et al.*, 2005; Graber *et al.*, 2010), en concordancia con los resultados de nuestro estudio. Sin embargo, la expresión proteica de CPT1 no cambió durante todo el período evaluado, a pesar de que su expresión génica aumentó significativamente durante el postparto. En este sentido, otros investigadores han descripto en vacas lecheras efectos postranscripcionales que probablemente podrían explicar la diferencia aquí observada entre la expresión génica y proteica de CPT1 (Baravalle *et al.*, 2015; Mann *et al.*, 2018). Además, un estudio previo que evaluó la actividad de la CPT1 en el hígado durante el PT y con diferentes dietas preparto no encontró diferencias después del parto (Dann y Drackley, 2005).

Por otro lado, la expresión de la proteína ACOX1 comenzó a incrementarse después del parto, pero fue significativo en el día 56 postparto, posterior al incremento observado en su expresión génica. A su vez, ACOX1 es una enzima regulada por el receptor nuclear PPAR $\alpha$ . Al respecto, en el hígado de ratas Wistar alimentadas con diferentes dietas, se encontró una relación entre la masa proteica y el tiempo de expresión de PPAR $\alpha$  con la actividad ACOX (Hein *et al.*, 2010). Por lo tanto, decidimos medir la expresión proteica de PPAR $\alpha$  y encontramos que aumentó significativamente el día 28 después del parto. Otros autores han evaluado la expresión génica de PPAR $\alpha$ , pero sus conclusiones no han sido completamente claras. Mientras que algunos autores han registrado un aumento postparto en el ARNm de PPAR $\alpha$  (Loor *et al.*, 2005), otros no detectaron cambios o incluso evidenciaron una disminución en su expresión génica (Graber *et al.*, 2010).

En el presente trabajo la expresión génica de algunas enzimas involucradas en la oxidación de ácidos grasos aumentó después del parto. Sin embargo, un aumento significativo en sus expresiones proteicas y del receptor nuclear que las regula no se produjo hasta el día 28 postparto. Aún más, la expresión proteica de CPT1 se mantuvo sin cambios durante el estudio.

Existe evidencia sobre la relación entre las altas concentraciones de AGNE y las enfermedades infecciosas y los trastornos metabólicos en el ganado lechero durante el PT (Drackley, 1999), particularmente en los primeros 10 días después del parto (Ingvarsen *et al.*, 2003). Por lo tanto, los incrementos en la expresión proteica de ACOX1 y PPAR $\alpha$  como los aquí registrados, probablemente ocurran posterior al PT. Por lo tanto, no queda claro si un aumento en la capacidad de oxidación del hígado en dicho momento crítico podría ayudar a prevenir enfermedades y mejorar la producción lechera. En los últimos años, diversos estudios han evaluado diferentes estrategias para mejorar la transición de la gestación a la lactancia con interesantes resultados (Smith *et al.*, 2009; Gohary *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015a; Roche *et al.*, 2015; Selim *et al.*, 2015; Shahzad *et al.*, 2015; Vailati Riboni *et al.*, 2015). Al respecto, este estudio además proporciona resultados valiosos sobre la expresión proteica de las enzimas involucradas en el metabolismo de los lípidos del hígado, junto con su expresión génica y metabolitos séricos, que podrían ayudar a caracterizar mejor el metabolismo del ganado lechero durante el PT. Se necesitan más estudios para lograr un mejor conocimiento de este período, en particular la adaptación del hígado y su importancia en la transición de la gestación a la lactancia.

## **CAPÍTULO III.**

Estudio II: Asociación entre el metabolismo de los ácidos grasos en el hígado y el rendimiento reproductivo

### III. 1. INTRODUCCIÓN

Terminado el PT, la vaca lechera tiene que volver a quedar preñada. La eficiencia reproductiva del ganado lechero es uno de los principales factores que afectan la rentabilidad de la producción lechera (Giordano *et al.*, 2011). Esto es debido a que en el comienzo de la lactancia se produce la mayor producción de leche (pico de lactancia), pero a su vez hay una relación negativa entre los días de lactación y la eficiencia de conversión del alimento consumido a litros de leche (Britt *et al.*, 2003). Sin embargo, una mayor capacidad genética para la producción de leche se ha asociado con una menor fertilidad (Butler, 2000). Relacionado a esto último, los trastornos reproductivos se han asociado con un aumento del BEN durante el postparto. Además, el BEN se relaciona con un menor CMS y una mayor CC en el parto (Akbar *et al.*, 2015). Siendo la relación entre la reproducción y el metabolismo periparto el elemento central de este capítulo, a continuación se revisarán los mecanismos endócrinos que influyen sobre la reproducción en las vacas lecheras.

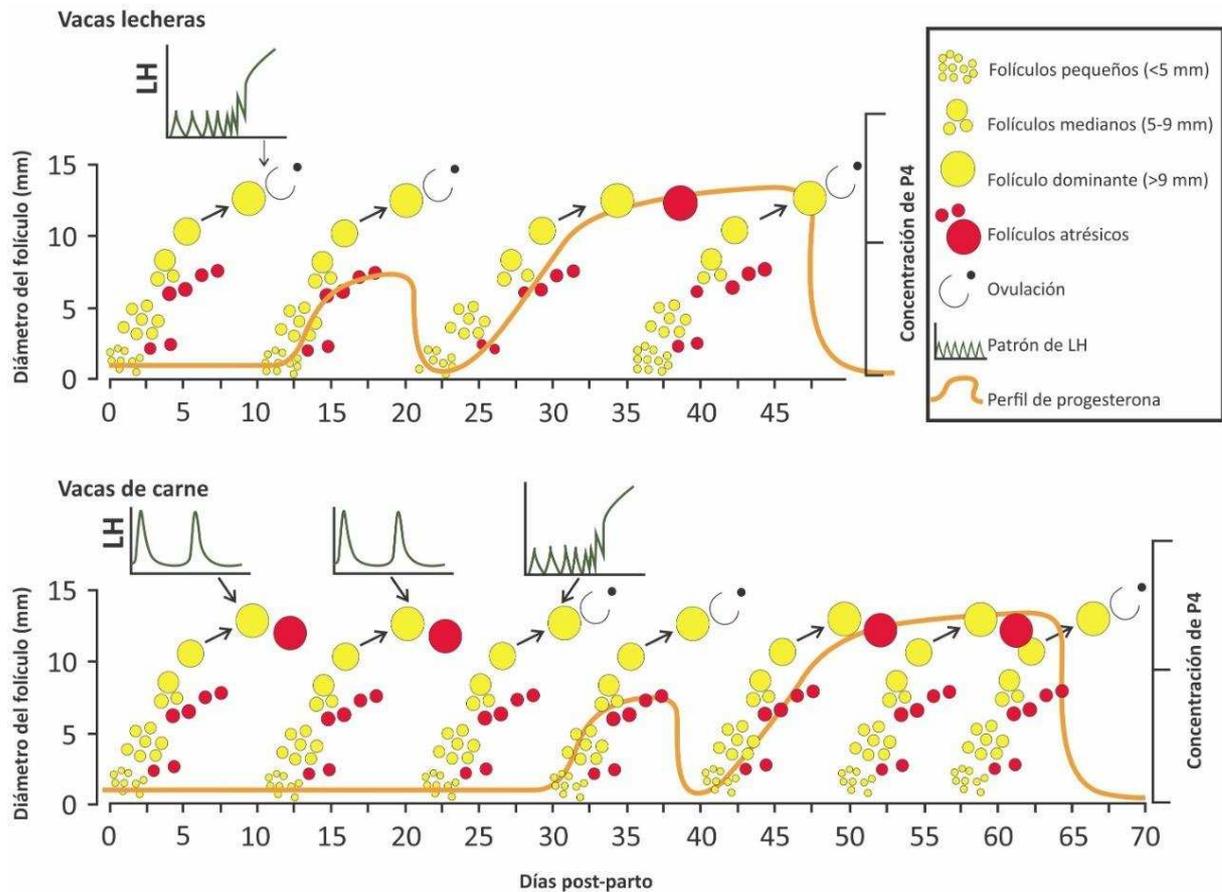
#### III. 1. 1. Reinicio de la actividad ovárica

Durante la gestación la placenta produce grandes cantidades de hormonas esteroides y una vez producido el parto se pierde la inhibición ejercida por las mismas sobre el hipotálamo y la hipófisis. Esto permite la reanudación casi inmediata de aumentos transitorios y recurrentes en las concentraciones de la hormona folículo estimulante (FSH, por sus siglas en inglés) independiente a regulación metabólica (Kawashima *et al.*, 2012). El primero de estos aumentos estimula la primera ola de crecimiento folicular posparto que generalmente produce un folículo dominante entre 7 y 10 días después del parto. Sin embargo, el futuro de este y de los siguientes ciclos foliculares depende en gran medida de la frecuencia y la intensidad de los pulsos de la hormona luteinizante (LH, por sus siglas en inglés).

Entre los días 10 y 20 posparto, la liberación pulsátil de LH aumenta en las vacas lecheras (o en vacas de carne sin “ternero al pie”). La frecuencia de pulso de LH concurrente determina el destino del primer folículo dominante en la onda folicular que depende de su capacidad para secretar suficiente estradiol para inducir un aumento de esta gonadotropina. La capacidad de secreción de estradiol depende a su vez de la frecuencia de pulso de LH predominante durante la fase dominante de la onda folicular. Por lo tanto, el principal impulsor de la ovulación de un folículo dominante durante el período posparto es la frecuencia de pulso de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH, por sus siglas en inglés) y en consecuencia de LH. En vacas de carne con “cría al pie”, el efecto supresor de la succión y la unión de la madre y el ternero sobre la secreción hipotalámica de GnRH impide el establecimiento de la

frecuencia de pulso de LH requerida para la síntesis de estradiol, la inducción de un aumento de LH pre-ovulatorio y finalmente la ovulación (Crowe *et al.*, 2014). La vaca lechera no tiene el efecto supresor derivado de la presencia del ternero, pero igualmente la frecuencia y la intensidad de los pulsos de LH desencadena si el primer folículo dominante puede ovular, sufrir atresia o volverse quístico (Lucy, 2003). La primera ovulación es generalmente silenciosa (sin demostración de celo) y generalmente seguido de un ciclo corto, que generalmente contiene solo una onda folicular. Por lo tanto, el cuerpo lúteo retrocede en forma prematura aproximadamente en los días 8-10 del ciclo, con la segunda ovulación (de este folículo dominante post-ovulatorio) ocurriendo aproximadamente los días 9-11 después de la primera ovulación. Esta segunda ovulación generalmente se asocia con la expresión de celo y una fase lútea de longitud normal (Crowe *et al.*, 2014) (Figura 14). La presencia de cuerpo lúteo determina un aumento en la concentración de progesterona que se convierte en el factor principal que afecta la frecuencia del pulso de LH. En general, las vacas lecheras Holstein lactantes tienden a tener concentraciones de progesterona más bajas durante el ciclo que las vaquillas cíclicas. Estas concentraciones más bajas de progesterona tienden a permitir un aumento sutil en la frecuencia del pulso de LH y permiten un crecimiento prolongado de cada folículo dominante. De esta manera se determinan fases lúteas prolongadas las que se ha asociado a trastornos reproductivos en vacas lecheras una vez reiniciada la actividad ovárica como enfermedad quística ovárica, ovulación retrasada, reducción de la duración y/o intensidad del estro conductual (Sartori *et al.*, 2004; Díaz *et al.*, 2015; Ortega *et al.*, 2016).

Como se ha descrito la FSH no parece ser un factor limitante para el inicio de los ciclos estrales postparto y sólo tiene una función facilitadora o permisiva. Sin embargo, el reinicio de la ciclicidad postparto, así como el mantenimiento normal de la misma, es en gran medida dependiente de LH. En el contexto metabólico de la vaca lechera postparto, existe evidencia para vincular muchos factores (a través de diferentes hormonas y metabolitos) a una frecuencia de pulso LH reducida. A su vez, los mismos metabolitos y hormonas (u otros) que influyen la secreción de GnRH/LH pueden actuar directamente en el ovario influyendo sobre la sensibilidad a las gonadotropinas.



**Figura 14.** Esquema de la reanudación de la ciclicidad ovárica durante el período postparto en vacas de leche y de carne. Adaptado de Crowe *et al.* (2014).

### III. 1. 2. Factores que afectan el reinicio de la actividad ovárica

El rápido incremento en los requerimientos de lactación y el BEN generan en la vaca postparto una repartición de nutrientes donde los mismos son prioritariamente redireccionados para la producción lechera. Esta realidad puede afectar la concentración de hormonas que controlan la función reproductiva (Butler, 2000). La mayor parte de los estos elementos que determinan esta repartición fueron descritos en el capítulo anterior, sólo se repasarán a continuación los elementos más importantes.

La concentración sanguínea de la GH aumenta rápidamente después del parto, en concordancia con el "desacoplamiento" en el eje de la GH. En el hígado, el incremento de GH postparto estimula la gluconeogénesis y en el tejido adiposo incrementa la lipólisis, la que eleva la concentración sanguínea de AGNE. Estos AGNE pueden ser oxidados en los tejidos hepáticos o extra-hepáticos, o pueden ser incorporados directamente en la grasa de la leche. Por su parte, las bajas concentraciones de glucosa en el postparto, como consecuencia de la síntesis de lactosa por parte de la glándula mamaria, están asociadas con bajas concentraciones

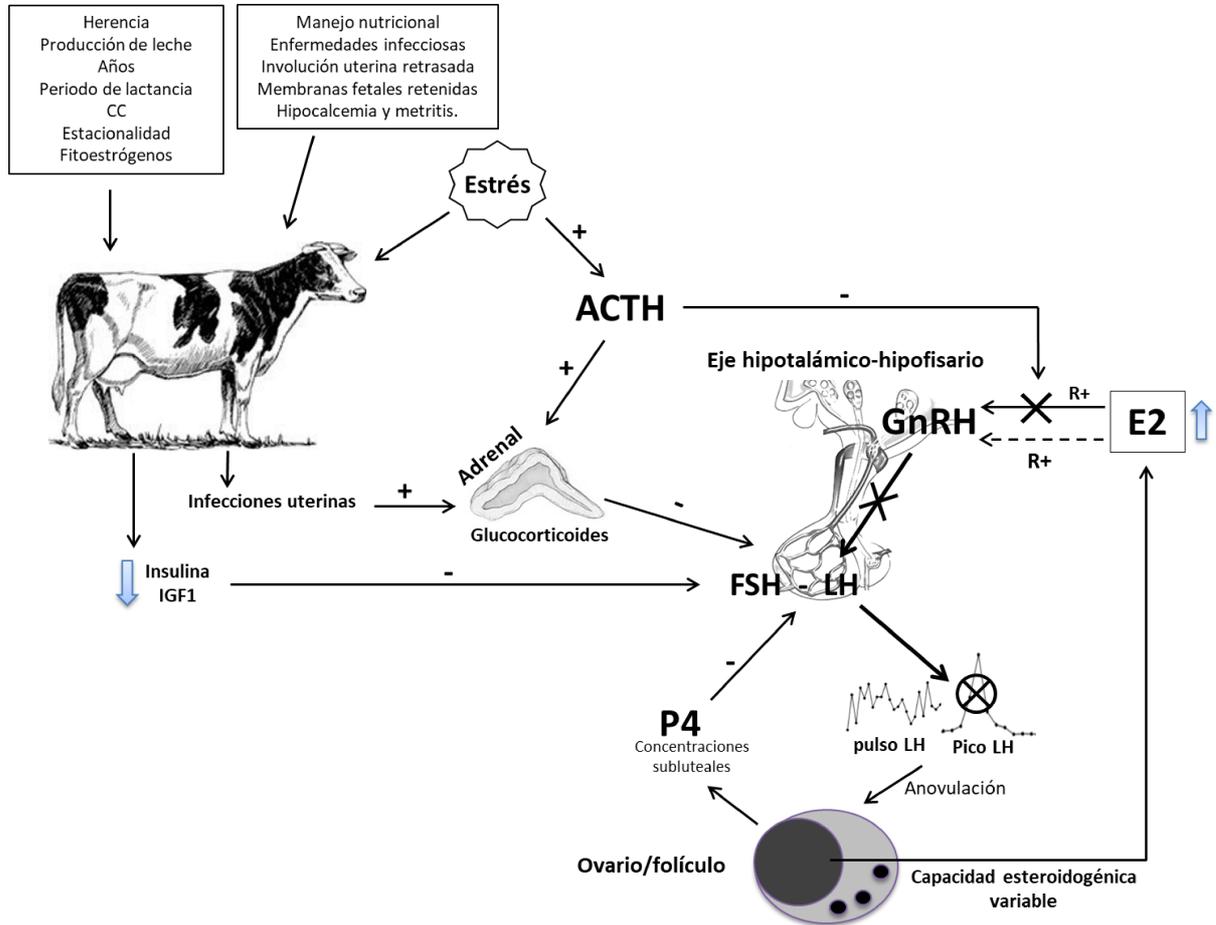
sanguíneas de insulina. Además, se evidencia una resistencia insulínica transitoria durante este período, particularmente en vacas lecheras de alta producción. Las bajas concentraciones de insulina y la resistencia insulínica redirigen las reservas de glucosa hacia la glándula mamaria, donde su ingreso es independiente de la hormona pancreática.

### III. 1. 3. Relación entre la repartición de energía y la reproducción

El reinicio de la actividad ovárica es un proceso multifactorial donde numerosos factores intervienen sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal antes descrito (Figura 15). En vacas lecheras no existe el efecto de mamado y el de presencia del ternero, principal efecto supresor de la ciclicidad posparto de en vaca de carne. Sin embargo, estudios previos han descrito la acción de la CC, el balance energético, el número de lactancia, la estación del año, y enfermedades concurrentes (Crowe *et al.*, 2014). El CMS, la CC y la producción de leche interactúan para afectar el equilibrio energético en las vacas lecheras. En este sentido, se ha descrito que el incremento en la producción lechera se ha acompañado de mayores problemas reproductivos (Butler, 2000; Royal *et al.*, 2000; Crowe *et al.*, 2014). Sin embargo, el aumento de la producción láctea podría repercutir en la reproducción indirectamente al afectar el balance energético. En este sentido, un gran estudio epidemiológico realizado por Opsomer *et al.* (2000) determinó que el principal factor de riesgo para un intervalo prolongado hasta la primera ovulación era la pérdida de la CC postparto. Los cambios en la puntuación de la CC son buenos indicadores del equilibrio energético. Las vacas que pierden una CC excesiva ( $> 1$ ) tienen un intervalo postparto más largo hasta la primera ovulación (Roche *et al.*, 2009). A su vez, la pérdida de CC postparto suele estar relacionada a la CC al parto. La evidencia actual sugiere que las vacas lecheras deberían parir con una CC de 3,0 - 3,25 y perder menos de 1 punto entre el parto y el primer servicio en lugar de las recomendaciones anteriores de 3,5 (Roche *et al.*, 2013b). Por lo tanto, el monitoreo de la CC desde momentos antes del parto hasta el primer servicio es esencial para un buen manejo reproductivo.

En este sentido, junto con la CC, las concentraciones de AGNE y BHB se han utilizado como índices del BEN (Ospina *et al.*, 2010a). Se han realizado varios estudios en los que se detectó una asociación entre el aumento de las concentraciones plasmáticas de AGNE y BHB y la menor eficiencia reproductiva (Ospina *et al.*, 2010a). A su vez, en estudios *in vitro* las altas concentraciones de AGNE se relacionaron con una reducción en el desarrollo de ovocitos y en la viabilidad de las células granulosas de vacas (Kor y Moradi, 2013). Estos y otros resultados *in vitro* han acrecentado el interés por el estudio del líquido folicular (LF) en íntimo contacto con el ovocito y las células foliculares. En diferentes especies, los resultados de varios estudios

indican que existe una asociación entre la concentración de metabolitos en la sangre y el LF, el cual en última instancia podría comprometer la funcionalidad ovárica (Leroy *et al.*, 2004; Nandi *et al.*, 2007; Abd Ellah *et al.*, 2010; Albomohsen *et al.*, 2011).



**Figura 15.** Representación esquemática del proceso multifactorial y posibles vías involucradas en las alteraciones ováricas postparto en vaca lechera. Adaptado de Ortega *et al.* (2016).

También la insulina y el IGF1 se han relacionado con el BEN y tienen efecto sobre la reproducción. Sus concentraciones aumentan gradualmente durante el postparto y vacas con mayor BEN tienen menor concentración de insulina e IGF1. La insulina e IGF1 influyen la secreción de GnRH y LH (Fenwick *et al.*, 2008). También las células ováricas tratadas con insulina o IGF1 tienen un mayor número de receptores gonadotróficos y mayor activación de la vía del segundo mensajero en respuesta a las gonadotropinas (Ortega *et al.*, 2016). Estos resultados han llevado al desarrollo de estrategias de alimentación glucogénica para las vacas lecheras en la función reproductiva, que promueva mayores concentraciones circulantes de insulina y glucosa a pesar del BEN (Gong *et al.*, 2002; McCarthy *et al.*, 2015b).

Por último, es importante destacar que la eficiencia reproductiva posparto no sólo tiene que ver con la repartición de energía o con el BEN. Las afecciones uterinas como las membranas fetales retenidas, la endometritis y la metritis contribuyen a la eficiencia reproductiva directamente al afectar la implantación. Sin embargo, en el postparto suelen aparecer además otras enfermedades como la mastitis y lesiones pódalas (Huszenicza *et al.*, 2005) que retrasan la reanudación de la ciclicidad normal. A su vez todas estas alteraciones pueden estar predisuestas por un BEN marcado (Bicalho *et al.*, 2009; Ospina *et al.*, 2010; Valde *et al.*, 2007) o predisponer a disminuciones del consumo generando cuadros de cetosis secundaria.

En este contexto, de estrecha relación entre el metabolismo y la función reproductiva postparto de las vacas lecheras, es importante tener en cuenta la posición central del hígado en la adaptación metabólica que se produce durante el periparto (van Dorland *et al.*, 2009). Como hemos explicado en el capítulo anterior, dentro del hígado, los ácidos grasos se pueden oxidar parcialmente para generar ATP, por la vía mitocondrial (donde interviene la CPT1), como por la vía peroxisomal (donde interviene la ACOX1); también puede reesterificarse a TG mediante la vía metabólica donde participa DGAT1 (Bionaz y Loor, 2012). La expresión de estas enzimas son inducidas por el receptor PPAR $\alpha$  que se ha estudiado ampliamente en no rumiantes, pero con hallazgos inconsistentes en rumiantes (Bionaz *et al.*, 2013). Se han realizado diversos estudios en los cuales se analizó la adaptación metabólica del hígado, principalmente a través de la abundancia de ARNm de diferentes genes diana hepáticos (Loor, 2010; Roche *et al.*, 2013c; Shahzad *et al.*, 2014). Andersen *et al.* (2002) y Carlson *et al.* (2007) han mostrado que una mayor capacidad de oxidación hepática de los ácidos grasos de cadena larga se asoció a una menor acumulación de TG en el hígado del ganado lechero. Sin embargo, aún no son claros los mecanismos capaces de afectar las adaptaciones durante la lactancia temprana y cuál es la contribución del hígado en estos procesos y los posibles efectos sobre el rendimiento de la reproducción.

Por lo tanto, en el presente capítulo, se propuso que el rendimiento reproductivo del ganado lechero estaría asociado con cambios en la expresión de proteínas hepáticas asociadas con la oxidación de ácidos grasos y la síntesis de TG durante el periparto. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue analizar la posible relación entre el intervalo parto-concepción (IPC) y las diferentes variables de plasma y LF, el contenido de TG en el hígado y la expresión hepática de proteínas relacionadas con el metabolismo de los ácidos grasos, como el PPAR $\alpha$ , CPT1, ACOX1 y DGAT1 en pastoreo de ganado lechero.

## III. 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### III. 2. 1. Procedimientos generales efectuados con animales

El presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la FCV-UNL (Protocolo número 158/2013, Santa Fe, Argentina) y todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con la Guía para el cuidado y uso de animales agrícolas en Investigación y Docencia (Federación de Sociedades de Ciencia Animal, 2010).

### III. 2. 2. Animales

Se seleccionaron vacas Holstein ( $n = 20$ ), próximas a iniciar su segunda a cuarta lactancia, del mismo tambo donde se realizó el estudio anterior con un sistema de alimentación a base de pasto y un promedio de producción de leche de aproximadamente 26 litros por día. Catorce días antes de la fecha estimada de parto, la CC de las vacas se registró en una escala de 1 a 5 con intervalos de 0,25, según lo descrito por Edmonson *et al.* (1989). Sólo las vacas con una CC mayor a 2,75 fueron consideradas para el estudio. Antes y durante los ensayos, los animales fueron evaluados clínicamente para el diagnóstico de placenta retenida, fiebre clínica de la leche, mastitis, metritis, cetosis clínica, abomaso desplazado, cojera y/o trastorno gastrointestinal clínico. Dos animales fueron excluidos del experimento porque desarrollaron metritis, por lo tanto, no completaron el programa de muestreo. Los datos de otros dos animales se excluyeron del análisis final porque estas vacas fueron diagnosticadas con endometritis clínica. Así, un total de 16 vacas multíparas fueron evaluadas a lo largo del estudio. Luego del parto, las vacas se ordeñaron dos veces al día y la producción de leche se registró mensualmente hasta 120 días en lactancia con medidores de leche (Waikato Milking Systems, Hamilton, Nueva Zelanda). Durante la lactancia, se determinó los IPC en cada grupo. Según su IPC, las vacas se dividieron en dos grupos: menor IPC (MeIPC,  $n = 8$ ;  $82 \pm 7$  días, media  $\pm$  SEM) y mayor IPC (MaIPC,  $n = 8$ ;  $156 \pm 22$  días, media  $\pm$  SEM).

### III. 2. 2. Alimentación

Durante el período previo al parto, las vacas fueron alimentadas con una dieta formulada utilizando el software NRC 2001, con 17% de ensilado de maíz, 17% de grano de maíz craqueado, 22% de harina de girasol, 26% de paja de trigo y 18% de heno de gramínea en una materia seca (MS) base. La dieta estaba compuesta por: 13% PC, 49% FDN, 32% FDA, 33% CNF y 1,40 Mca/kg de ENL, con un CMS estimado de 12 kg/día. Después del parto, los animales fueron alimentados con una dieta basada en 10% y 24% de MS de alfalfa y pastoreo de raygrass, mientras que los otros componentes de la dieta mixta fueron 24% de ensilaje de

maíz, 22% de grano de maíz craqueado, 10% de ensilaje de soja, 5% de soja harina y 5% de grano de trigo sobre una base MS. Esta dieta estaba compuesta por: 16% PC, 36% FDN, 21% FDA, 41% CNF y 1,63 Mcal/kg de ENL, con un CMS estimado de 15 kg/día. El consumo de alfalfa y raygrass fue *ad libitum* y se estimó como la diferencia entre la masa pre-pastoreo y post-pastoreo por m<sup>2</sup>, multiplicándose por el área asignada/vaca. Ambas dietas recibieron la suplementación mineral y vitamínica correspondiente.

### III. 2. 3. Muestras de sangre, liquido folicular e hígado

Las muestras de sangre y las biopsias hepáticas se obtuvieron a los 14 ( $\pm$  3) días antes de la fecha prevista de parto, y en los días 4 ( $\pm$  3), 14 ( $\pm$  3) y 28 ( $\pm$  3) después del parto (Figura 16). La toma de las muestras, su procesamiento inicial y su conservación se realizaron en base a lo descrito en el capítulo anterior.

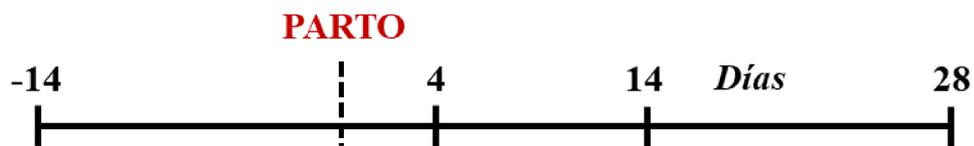


Figura 16. Diagrama de muestreo ensayo II y III

Luego de 28 días de lactancia, las vacas se sincronizaron mediante el protocolo descrito por Rivera *et al.* (2005) con algunas modificaciones: 100  $\mu$ g de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) (Gestar, OVER, Santa Fe, Argentina) en el día 0, inserción de un dispositivo intravaginal conteniendo 1 g de progesterona (Sincrover 1000, OVER, Santa Fe, Argentina) desde los días 0 a 6, y 25 mg de prostaglandina F2-alfa (PGF2-alfa) (Prostal, OVER, Santa Fe, Argentina) el día 6. En el día 8, los folículos preovulatorios se aspiraron utilizando un sistema ultrasónico digital Chison 8300vet equipado con un transductor micro-convexo de 5.0 MHz, montado en una sonda transvaginal para aspiración folicular (Watanabe Applied Technology Limited, Sao Paulo, Brasil) (Díaz *et al.*, 2018). Parte del LF se usó inmediatamente para medir BHB usando tiras reactivas como se describe más adelante. El resto del LF se refrigeró de inmediato, se transportó al laboratorio y se almacenó a -80 °C hasta que su análisis.

### III. 2. 4. Determinación de concentraciones de metabolitos y hormonas en plasma y LF

Las concentraciones plasmáticas de AGNE, BHB, glucosa, TG, insulina e IGF1, proteína plasmática total, albúmina y BilT, así como la actividad plasmática de AST y GGT se determinaron según lo descrito en el capítulo previo. Por su parte las concentraciones de

AGNE, BHB, glucosa, TG, insulina e IGF1 en LF se determinaron de la misma forma que las descritas para plasma. Por último, el contenido de TG hepático y la concentración relativa proteica de PPAR $\alpha$ , CPT1A, ACOX1 y DGAT1 se realizó de igual manera que la descrita en el estudio I.

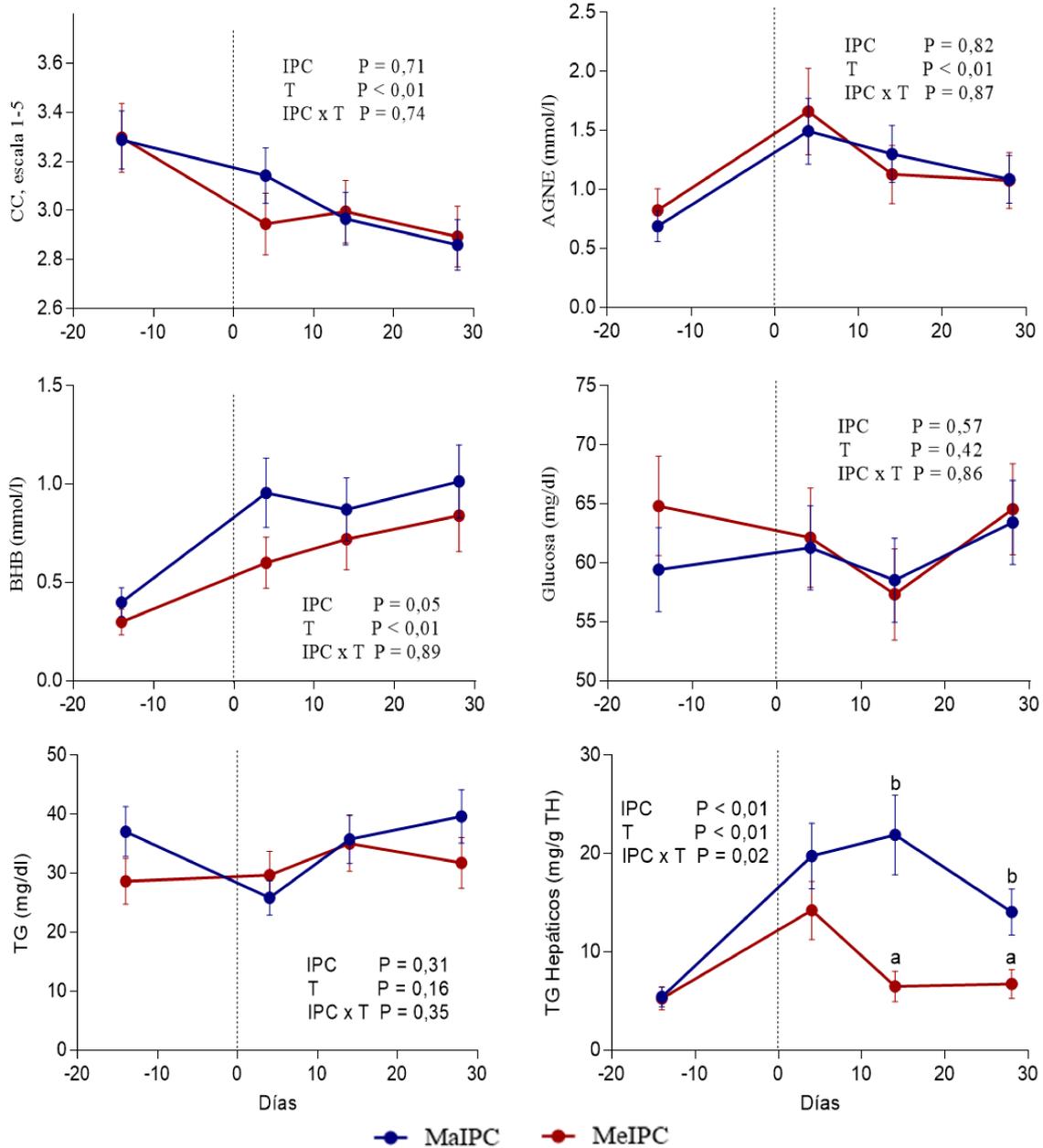
### **III. 2. 5. Análisis estadístico**

Los datos se analizaron utilizando el paquete de software estadístico SPSS 22.0 para WINDOWS (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.). La distribución de los datos se probó para determinar su normalidad utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los datos para la mayoría de las variables no se distribuyeron normalmente. Por lo tanto, para BHB en sangre total, así como para las determinaciones de plasma e hígado, se realizó un análisis de medidas repetidas utilizando un MLG con una función de enlace log para las variables con una distribución gamma. Para las variables con resultado de distribución normal, se utilizó un MLG con una función de enlace lineal. El modelo consistió en IPC, tiempo (T) e IPC  $\times$  T como efectos fijos, y el animal como efecto aleatorio. Para las determinaciones de LF, se utilizó un MLG con las funciones de enlace descritas descritas anteriormente y con IPC como efecto fijo. Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado significativo. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM.

### III. 3. RESULTADOS

#### III. 3. 1. Producción de leche, CC, parámetros plasmáticos y contenido de TG hepáticos

No hubo diferencias en la producción de leche después de los 120 días en lactancia entre los grupos de MaIPC ( $3,506 \pm 177$  L) y MeIPC ( $3,410 \pm 177$  L) ( $p > 0,05$ ). En cuanto a CC, hubo una reducción progresiva en el tiempo para los valores de esta variable ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, no hubo diferencias entre los grupos y tampoco efecto interacción IPC x T durante el estudio ( $p > 0,05$ ). Además, la concentración de AGNE aumentó durante el estudio, alcanzando el máximo en el día 4 postparto ( $p < 0,05$ ), sin observar diferencias entre los grupos o efecto interacción IPC x T durante el estudio ( $p > 0,05$ ). El patrón de concentración de BHB fue similar al de AGNE, con un aumento posterior al parto, donde este incremento en la concentración se mantuvo durante todo el período en el que se realizaron las evaluaciones ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, la concentración de BHB fue menor en el MeIPC que en el grupo de MaIPC ( $p < 0,05$ ), sin registrarse efecto de interacción IPC x T ( $p > 0,05$ ). Similar al comportamiento del BHB, el contenido de TG en el hígado aumentó postparto y fue menor en el grupo MeIPC que en el grupo MaIPC ( $p < 0,05$ ). Además, en este caso se pudo observar una interacción IPC x T durante el estudio, donde el contenido de TG en el hígado fue menor en el MeIPC que en el grupo de MaIPC en los días 14 y 28 postparto ( $p < 0,05$ ) (Figura 17).



**Figura 17.** CC, concentraciones plasmáticas de AGNE, BHB, glucosa y TG y contenido de TG en el hígado, entre el día 14 anterior al parto y el día 28 posterior al parto, en animales agrupados como vacas con mayor intervalo parto-concepción (MaIPC; n = 8) o menor intervalo parto-concepción (MeIPC; n = 8). Los valores representan la media  $\pm$  SEM. Se indican los efectos estadísticos de IPC, T e IPC x T; <sup>a,b</sup>IPC  $\times$  T (p < 0,05) entre IPC en una semana determinada. Adaptado de Angeli *et al.* (2019b)

Las concentraciones de glucosa y TG en plasma no fueron diferentes entre los grupos a lo largo del tiempo y no hubo efecto interacción IPC x T durante el estudio (p > 0,05; Figura 17). Con respecto a los biomarcadores de la función hepática, para los valores de BilT hubo una interacción durante el estudio debido a la menor concentración en el grupo MeIPC que en el grupo MaIPC en el día 28 postparto (p < 0,05). Las actividades de las enzimas AST y GGT

aumentaron postparto ( $p < 0,05$ ), sin embargo, no hubo diferencias entre los grupos o efecto interacción ( $p > 0,05$ ). Por su parte, las concentraciones de IGF1 cambiaron a lo largo del tiempo registrándose la menor concentración en el día 4 postparto ( $p < 0,05$ ); sin diferencias entre grupos o interacción IPC x T durante el estudio ( $p > 0,05$ ). No hubo diferencias en las concentraciones de insulina, proteína total y albúmina y la actividad de ALP entre los grupos, ni hubo un efecto interacción IPC x T ( $p > 0,05$ ; Tabla 6).

**Tabla 6.** Concentración de insulina, IGF1, proteína, albúmina, BilT y actividad de AST, GGT y ALP en plasma en vaca lechera.

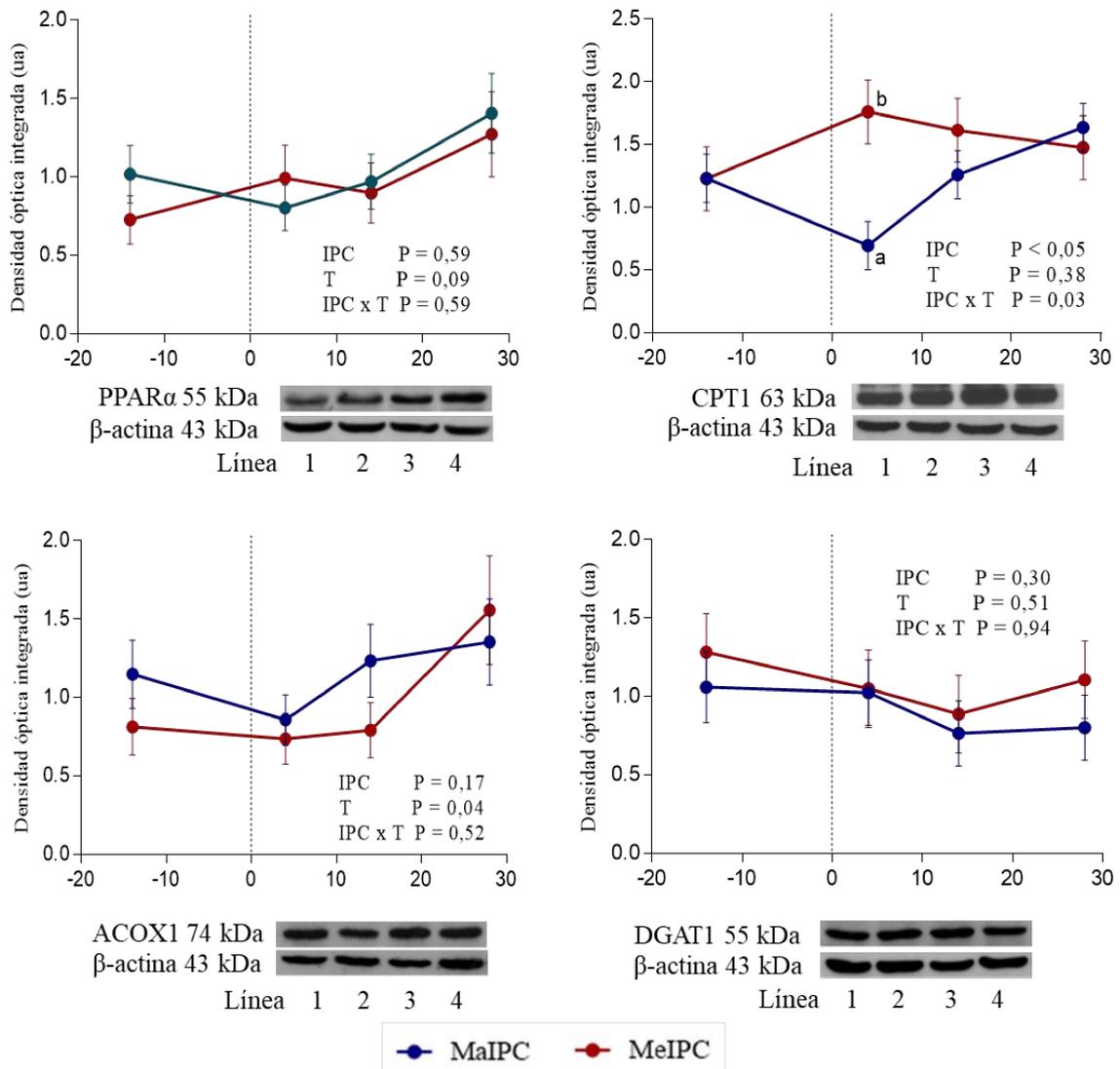
		<i>Días Preparto</i>		<i>Días Postparto</i>				IPC	T	IPC x T
		-14	4	14	28					
<b>Insulina</b> (ng/ml)	MeIPC	0,98 ± 0,32	0,69 ± 0,20	0,46 ± 0,14	0,53 ± 0,15	0,46	0,57	0,24		
	MaIPC	0,53 ± 0,13	0,51 ± 0,13	0,76 ± 0,19	0,45 ± 0,11					
<b>IGF1</b> (ng/ml)	MeIPC	126,08 ± 22,50	91,29 ± 22,50	176,99 ± 22,50	140,82 ± 22,50	0,79	< 0,01	0,29		
	MaIPC	144,26 ± 19,01	69,79 ± 19,01	135,84 ± 19,01	169,59 ± 19,01					
<b>Proteína</b> (g/dl)	MeIPC	7,16 ± 0,37	6,96 ± 0,36	7,21 ± 0,37	7,49 ± 0,38	0,19	0,07	0,73		
	MaIPC	7,55 ± 0,33	6,83 ± 0,29	7,63 ± 0,33	8,15 ± 0,35					
<b>Albúmina</b> (g/dl)	MeIPC	3,18 ± 0,15	3,23 ± 0,15	3,06 ± 0,15	3,01 ± 0,15	0,41	0,95	0,40		
	MaIPC	3,07 ± 0,12	2,92 ± 0,12	3,04 ± 0,12	3,15 ± 0,12					
<b>BilT</b> (mg/dl)	MeIPC	1,26 ± 0,16	1,60 ± 0,16	1,71 ± 0,16	1,10 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,66	0,10	0,05		
	MaIPC	1,34 ± 0,13	1,58 ± 0,13	1,37 ± 0,13	1,57 ± 0,13 <sup>b</sup>					
<b>AST</b> (UI/l)	MeIPC	119,05 ± 13,25	106,24 ± 13,25	138,77 ± 13,25	136,69 ± 13,25	0,76	0,05	0,83		
	MaIPC	111,16 ± 11,20	120,61 ± 11,20	137,64 ± 12,10	142,11 ± 11,20					
<b>GGT</b> (UI/l)	MeIPC	20,37 ± 2,56	27,24 ± 2,56	28,17 ± 2,56	23,54 ± 2,56	0,49	0,01	0,86		
	MaIPC	20,00 ± 2,16	27,55 ± 2,16	24,60 ± 2,16	22,54 ± 2,16					
<b>FA</b> (UI/l)	MeIPC	24,98 ± 3,92	28,44 ± 3,92	24,68 ± 3,92	26,15 ± 3,92	0,19	0,94	0,75		
	MaIPC	28,47 ± 3,31	27,17 ± 3,31	30,20 ± 3,31	31,91 ± 3,31					

Los animales se agruparon como vacas con MaIPC ( $n = 8$ ) o MeIPC ( $n = 8$ ) a los 14 días antes del parto, y a los 4, 14 y 28 días después del parto. Los valores se expresan como media ± SEM. Se indican los efectos estadísticos de IPC, T y IPC x T; <sup>a,b</sup>IPC x T ( $p < 0,05$ ) entre IPC en una semana determinada. Adaptado de Angeli et al. (2019b)

### III. 3. 2. Expresión proteica de enzimas y receptor nuclear

La expresión proteica de CPT1 fue mayor en el grupo MeIPC que en el grupo de MaIPC ( $p < 0,05$ ). Además, hubo una interacción entre los valores para los dos grupos durante el estudio debido a la mayor expresión proteica en las vacas del grupo MeIPC en el día 4 ( $p < 0,05$ ), pero sin registrar diferencias en los días 14 y 28 ( $p > 0,05$ ). La expresión proteica de ACOX1 aumentó con el tiempo ( $p < 0,05$ ), pero sin registrar diferencias entre los grupos o efecto interacción IPC x T durante el estudio ( $p > 0,05$ ). Similar a ACOX1, la expresión relativa de PPAR $\alpha$  tendió a aumentar con el tiempo ( $p = 0,09$ ), aunque no hubo diferencias entre animales de distinto IPC o respecto a la interacción entre los valores de los dos grupos durante

el tiempo ( $p > 0,05$ ). Además, no se registraron diferencias en expresión proteica de DGAT1 entre los grupos, y a lo largo del tiempo o se registró efecto interacción IPC x T ( $p > 0,05$ ; Figura 18).



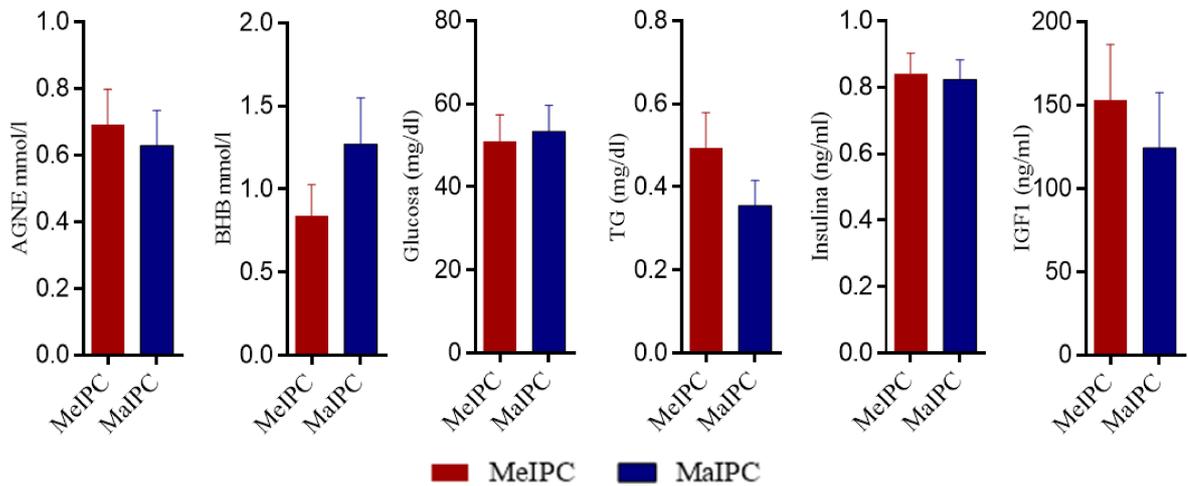
**Figura 18.** Expresión proteica de CPT1, ACOX1, PPAR $\alpha$  y DGAT1 entre el día 14 anterior al parto y el día 28 posterior al parto en animales agrupados como vacas con mayor intervalo parto-concepción (MaIPC;  $n = 8$ ) o menor intervalo parto-concepción (MeIPC;  $n = 8$ );

Parte superior: Densidad óptica integrada (ua: unidades arbitrarias), determinada por Western blot. Los valores representan medias  $\pm$  SEM. Se indican los efectos estadísticos de IPC, T y IPC x T; <sup>a,b</sup>IPC x T ( $p < 0,05$ ) entre IPC en una semana determinada

Parte inferior: Inmunomarcación representativa. El peso molecular se indica a la derecha. Línea 1: días 14 y 14 preparto; líneas 2 a 4: días 4, 14 y 28 postparto. Adaptado de Angeli et al. (2019b)

### III. 3. 3. Parámetros evaluados en líquido folicular

Las concentraciones de AGNE, BHB, glucosa, TG, insulina e IGF1 en LF fue similar entre los grupos ( $p > 0,05$ ; Figura 19).



**Figura 19.** Concentraciones en LF de AGNE, BHB, glucosa, TG, insulina e IGF1 en el día 37 ( $\pm 3$ ) posterior al parto; Los animales se agruparon como vacas con mayor intervalo parto-concepción (MaIPC;  $n = 8$ ) o menor intervalo parto-concepción (MeIPC;  $n = 8$ ); Los valores representan la media  $\pm$  SEM. Adaptado de Angeli et al. (2019b)

### III. 4. DISCUSIÓN

En los últimos años numerosos autores han intentado relacionar parámetros metabólicos de la vaca lechera postparto con la eficiencia reproductiva de la misma. En este sentido, la concentración de metabolitos y hormonas se han evaluado a fin de comprender su función sobre la reproducción (Lucy, 2003; Ospina et al., 2010). Sumado a esto, como vimos en el capítulo anterior, diversos estudios han analizado la expresión génica y la concentración de moléculas relevantes que afectan diferentes vías del metabolismo hepático de la vaca lechera en relación con los efectos de diferentes dietas o tratamientos y con el objetivo de mejorar la producción de leche o el estado de salud (Loor *et al.*, 2006; Selim *et al.*, 2015; Vailati Riboni *et al.*, 2015; Mann *et al.*, 2018). En este capítulo, buscamos relacionar estos elementos, evaluando la fertilidad de la vaca lechera (particularmente el IPC) y su relación con el metabolismo de los ácidos grasos del hígado durante el periparto, de acuerdo a los indicadores seleccionados en muestras de plasma, LF y biopsias hepáticas.

La capacidad genética para aumentar la producción de leche se ha asociado con la menor fertilidad (Lucy, 2007; Mee, 2007). Sin embargo, la estrecha relación entre la producción de leche y la fertilidad no siempre es obvia (López-Gatius *et al.*, 2006; Patton *et al.*, 2007). En el presente estudio, no hubo asociación entre IPC y la producción de leche. Por otro lado, los resultados de otros estudios han indicado una relación entre una mayor CC y un mayor rendimiento de leche (Roche et al., 2013). En este sentido, al igual que con la producción de leche, no hubo diferencias en la CC entre los dos grupos.

La CC se ha asociado con un CMS menor y un BEN mayor en el periparto (Roche *et al.*, 2015), lo que podría comprometer a la futura fertilidad de las vacas. En este sentido, nosotros evaluamos las concentraciones plasmáticas de AGNE y BHB como biomarcadores del BEN. Los resultados indican que las concentraciones de AGNE en ambos grupos fueron ligeramente mayores que lo recomendado (Ospina *et al.*, 2010a; Chapinal *et al.*, 2012), sugiriendo que hubo una movilización de grasa en estas vacas. Sin embargo, no hubo asociación entre las concentraciones plasmáticas de AGNE y el IPC. Como ya mencionamos, tampoco hubo diferencias en la producción de leche y la CC entre los grupos, por lo que es de esperar que no existan diferencias en el CMS y el BEN entre los grupos. Los resultados de otros estudios en vacas en pastoreo indican que existe una asociación entre mayores concentraciones de AGNE y una ovulación retardada, posiblemente como resultado de un efecto negativo en el eje hipotalámico-hipofisario-gonadal (Giuliodori *et al.*, 2011). Además, resultados de estudios previos *in vitro* indican que los AGNE pueden tener efectos nocivos en la funcionalidad ovárica, como la inhibición de la supervivencia de las células granulosas bovinas, la alteración en el

desarrollo y la proliferación de las células foliculares y la alteración en el desarrollo de los ovocitos (Leroy *et al.*, 2012; Van Hoeck *et al.*, 2013).

En el presente estudio, la concentración de BHB en las vacas del grupo MaIPC fue ligeramente menor que el valor de referencia para la cetosis subclínica (Ospina *et al.*, 2010a), lo que indica (junto con los valores de AGNE) que estos animales no se habían sometido a una BEN grave. En concordancia con los resultados de estudios previos en los que hubo una asociación entre los rendimientos reproductivos menores y la cetosis subclínica (McArt *et al.*, 2013; Abdelli *et al.*, 2017), en el presente estudio hubo una asociación entre BHB y IPC. Leroy *et al.*, (2006) encontraron por medio de un estudio *in vitro* que hubo un efecto tóxico del BHB junto a una concentración moderada de glucosa (similar a las concentraciones registradas en el presente estudio) en la maduración de los ovocitos. En este sentido, se piensa que las concentraciones altas de BHB inhiben la ruta glucolítica en las células del cúmulo, lo que conduce a una falta de energía metabólica para las funciones de los ovocitos, comprometiendo el desarrollo embrionario temprano (Sarentonglaga *et al.*, 2013).

Los resultados de estudios anteriores también indican que existe una asociación entre el contenido de TG hepáticos y el BEN (Bobe *et al.*, 2004; Loor *et al.*, 2006). Al respecto, Bobe *et al.*, (2004) clasificaron el hígado de vaca lecheras según el contenido de TG en hígado graso severo (>10% del peso del tejido húmedo), moderado (5-10%), leve (1-5%) o normal (<1%). Estos autores además informaron que hubo una disminución en el CMS con un mayor contenido de TG en el hígado, pero sólo frente a un grado severo de lipidosis hepática. Sin embargo, en el presente estudio, el contenido de TG en el hígado de las vacas fue inferior al 10% en peso húmedo. De esta forma, junto a la ya discutida falta de diferencia en la concentración de CC y AGNE entre los grupos, y al contenido de TG en el hígado menor al 10% de peso húmedo, es posible que los IPC no estén asociados con el BEN. Sin embargo, se pudo observar un mayor contenido de TG hepático en los animales del grupo MaIPC. En particular, en los días 14 y 28 postparto, las vacas del grupo MaIPC tenían un hígado ligeramente graso en comparación con las del grupo MeIPC, que tenía una morfología hepática normal (Bobe *et al.*, 2004). Estos hallazgos son consistentes con los de Jorritsma *et al.* (2000), quienes registraron una relación negativa entre el mayor contenido de TG hepático y el IPC. Como se describió anteriormente en este manuscrito, la concentración plasmática de AGNE no fue diferente entre los grupos, pero la menor concentración de BHB y el contenido de TG en el hígado de vacas del grupo MeIPC podrían indicar que hubo una mejor adaptación a la movilización de lípidos postparto.

En este capítulo también se evaluaron las concentraciones plasmáticas de glucosa, insulina e IGF1 en todos los grupos, pero no se encontraron asociaciones entre los valores de

estas variables y el IPC. Resultados de estudios previos indican que existe una asociación entre las mayores concentraciones de estos compuestos y un mejor rendimiento reproductivo (Velazquez *et al.*, 2008; Garverick *et al.*, 2013); si bien los resultados de otros estudios no han sido concluyentes (van Knegsel *et al.*, 2005; Wathes, 2012). Estos compuestos se han asociado con el BEN, disminuyendo cuando este último aumenta (Crowe *et al.*, 2014). Así, la ausencia de diferencias en las concentraciones plasmáticas de glucosa, insulina e IGF1 entre grupos, sumado a lo anteriormente descrito respecto a la CC y las concentraciones de AGNE, sustenta la ausencia de diferencias en el BEN entre los grupos (Kawashima *et al.*, 2012).

En otros estudios se ha determinado la importancia de otros parámetros sanguíneos y su asociación con la funcionalidad hepática (Bertoni *et al.*, 2009; Bertoni y Trevisi, 2013). En concordancia con resultados previos de Bertoni *et al.* (2008), donde hubo menores concentraciones de PFA- y del clearance de la bilirrubina, asociadas con un rendimiento reproductivo menor, en el presente estudio se registró una mayor concentración plasmática de BilT en las vacas del grupo MaIPC. Para las actividades de AST y GGT, (relacionadas con daño hepático orgánico) no hubo asociación con el IPC de las vacas. De tal forma que en el presente estudio no se observó daño hepático en las vacas. Sin embargo, la concentración plasmática de BilT podría estar relacionada con el mayor contenido de TG hepático en el grupo de MaIPC, pudiendo comprometer las funciones hepáticas.

Por otro lado, en el presente estudio analizamos algunos metabolitos relevantes en el LF de los folículos preovulatorios debido al contacto íntimo de este líquido con los ovocitos en desarrollo y porque es un indicador de las actividades secretoras, el metabolismo y la disponibilidad de nutrientes de las células foliculares. En un estudio previo *in vivo* en vacas con enfermedad quística ovárica, se registraron menores concentraciones de glucosa y TG junto a una mayor concentración de AGNE en los LF de las vacas con esta enfermedad (Gareis *et al.*, 2018). La enfermedad quística ovárica en el ganado lechero ocurre con mayor frecuencia durante el período postparto temprano, en el momento en que se reanuda la actividad ovárica normal (Ortega *et al.*, 2016). En el presente estudio, sin embargo, la concentración en LF de AGNE, BHB, glucosa, TG, insulina e IGF1 no se asociaron con el IPC de las vacas. Resulta bien conocido que algunos metabolitos y hormonas metabólicas afectan la fertilidad, no sólo directamente en el entorno de los ovarios y los folículos, sino también indirectamente al modular el eje gonadotrófico-somatotrófico (Leroy *et al.*, 2008; Ortega *et al.*, 2016). En el presente estudio hubo un aumento de las concentraciones plasmáticas de BHB en etapas previas al muestreo de LF. Por lo tanto, y de acuerdo con los hallazgos de un estudio anterior (McArt *et al.*, 2013), los cambios que ocurren durante el periparto en metabolitos sistémicos relevantes

podrían tener efectos directos e indirectos en las funciones ováricas y, posteriormente, tener consecuencias en el rendimiento reproductivo.

El BEN postparto no sólo afecta las funciones ováricas sino también el metabolismo hepático (particularmente a través del aumento en la concentración de AGNE), con posibles consecuencias indirectas en la producción y reproducción de la leche (Bobe *et al.*, 2004). Una vía metabólica para los AGNE en el hígado podría ser la oxidación mitocondrial, donde la CPT1 tiene una función importante. Uno de los principales elementos que promueven la actividad de CPT1 es la mayor concentración de AGNE. Sin embargo, aunque no hubo diferencias en las concentraciones de AGNE en plasma de vacas con diferentes IPC, la expresión proteica de CPT1 fue mayor en las vacas del grupo MeIPC. Más aún, Li *et al.* (2012) informaron que el hígado de vacas con cetosis clínica tenía menor expresión génica de *CPT1*, a pesar de encontrar una mayor concentración sérica de AGNE. En un estudio *in vitro* con hepatocitos de vacas se registró una mayor expresión génica y proteica de CPT1 asociada con un aumento en las concentraciones de AGNE, cuando las concentraciones fueron menores a 1,6 mmol/l, pero una disminución cuando hubo un aumento en la concentración de AGNE con concentraciones mayores a 1,6 mmol/l (Li *et al.*, 2013). En el presente estudio, la concentración de AGNE fue de aproximadamente 1,6 mmol/l en el día 4 postparto, disminuyendo luego durante el transcurso del estudio. Además, se registró una mayor expresión proteica de CPT1 en hígado de vacas del grupo MeIPC en el día 4 postparto, previo al momento en que se detectó el menor contenido de TG hepáticos en esos animales (los días 14 y 28 postparto). Por lo tanto, la mayor expresión proteica de CPT1, índice de oxidación mitocondrial, podría tener efectos positivos sobre la funcionalidad hepática y en consecuencia sobre la salud y el IPC de las vacas. Louet *et al.* (2001) informaron que la oxidación de los ácidos grasos está controlada por cambios en la actividad de la CPT1 y la concentración de malonil-CoA, debido a la sensibilidad que posee la CPT1 a la inhibición por este compuesto. De esta forma, el malonil-CoA se ha propuesto como un regulador de la actividad de la CPT1 tanto en rumiantes como en no rumiantes (Han van der Kolk *et al.*, 2017). Sin embargo, los resultados de un estudio previo con vacas lecheras periparturientas, alimentadas con una dieta restringida durante el período preparto, aumentaron la actividad de la CPT1 pero no la sensibilidad a malonil-CoA (Dann y Drackley, 2005). En el presente estudio no hubo una evaluación de los efectos sobre la CPT1 en animales con diferentes IPC, por lo que resultan necesarios estudios adicionales para dilucidar posibles asociaciones de CPT1 a otras vías metabólicas y/o funciones biológicas.

En el ganado bovino, tanto la oxidación mitocondrial como la peroxisomal son importantes (Grum *et al.*, 1994). En el presente estudio, la expresión proteica de ACOX1

aumentó, pero sin registrar asociaciones con el IPC. Además, la ACOX1 peroxisomal es una enzima diana del receptor nuclear PPAR $\alpha$ . Teniendo en cuenta este hecho, y en concordancia con los hallazgos aquí presentados respecto a ACOX1, hubo una tendencia al aumento de la expresión proteica de PPAR $\alpha$  durante el estudio, sin registrar asociaciones respecto al IPC. En animales no rumiantes, los PPAR están involucrados en las principales regulaciones metabólicas e inflamatorias (Varga *et al.*, 2011), pero en rumiantes, los datos no son concluyentes. Al respecto, los resultados de estudios anteriores indicaron que no había diferencias en la expresión génica de PPAR $\alpha$  en animales con diferentes CC (Akbar *et al.*, 2015), o en vacas durante el parto con diferentes lípidos en la dieta y contenido de energía (Akbar *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2014). Sumado a esto, otros estudios han registrado incrementos en las concentraciones de AGNE posparto, pero con diferencias contradictorias en el patrón de expresión génica del PPAR $\alpha$  (alto y bajo ARNm), resultando en hallazgos inconsistentes que dificultan la interpretación del contexto metabólico (Drackley *et al.*, 2005; Graber *et al.*, 2010). Dadas las discrepancias respecto a los hallazgos referidos a este receptor nuclear y al importante rol que cumple en el metabolismo hepático de lípidos, sería interesante abordar otros estudios con agonistas y/o antagonistas que ayuden a interpretar mejor su participación en el hígado de rumiantes, particularmente en el parto de vacas lecheras.

Por otro lado, en el presente estudio se evaluó la expresión proteica de DGAT1, pero no se encontraron diferencias como resultado con respecto al IPC. Esto avalaría la hipótesis de que el contenido de TG en el hígado de los rumiantes no está relacionado con la síntesis de TG, sino que estaría modulado por la capacidad de secreción de VLDL (Kessler *et al.*, 2014), como fue discutido en el capítulo anterior.

En diversos estudios, se ha evaluado una relación entre la funcionalidad del hígado y la fertilidad. Jorritsma *et al.* (2000) informaron que había un mayor contenido de TG en el hígado asociado con una menor fertilidad más que a la producción de leche. Bertoni *et al.* (2008) propusieron que el deterioro de la función metabólica del hígado podría estar relacionado con una fertilidad reducida. Según nuestro conocimiento, el presente estudio es el primero en evaluar la expresión de proteínas relevantes involucradas en el metabolismo de los ácidos grasos hepáticos asociados con un parámetro del rendimiento reproductivo. Los resultados del presente capítulo indican que hay una mayor abundancia de proteínas relacionadas con la oxidación de los ácidos grasos del hígado en el grupo de MeIPC, que posiblemente contribuya al menor contenido de TG y a la menor concentración plasmática de BHB. El menor contenido de TG podría contribuir a la modulación de las funciones hepáticas, conduciendo posiblemente a un mayor clearance de la bilirrubina. Además, a partir de los resultados del presente estudio,

se puede concluir que un mejor rendimiento reproductivo de las vacas en lactancia podría asociarse con una mayor oxidación de ácidos grasos en el hígado, según los hallazgos sobre el menor contenido de TG y la mayor expresión proteica de CPT1 en hígado. Se requieren estudios adicionales de otras vías involucradas en el metabolismo de los lípidos para obtener una comprensión más completa y precisa sobre la adaptación del hígado de vacas lecheras durante el PT.

## **CAPITULO IV.**

Estudio III: Efecto de la condición corporal preparto sobre la señal de insulina y el estado inflamatorio hepático

## IV. 1. INTRODUCCIÓN

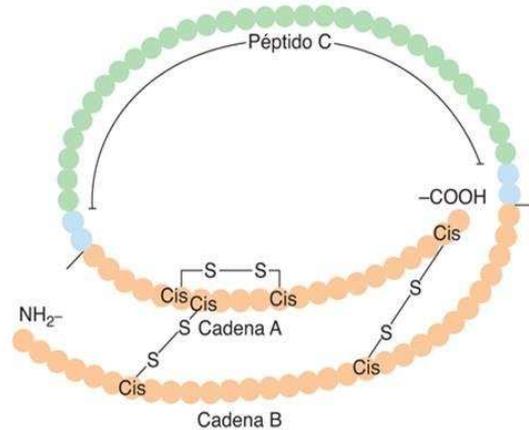
Como ya hemos mencionado anteriormente, la glándula mamaria de la vaca lechera postparto posee una alta demanda de glucosa, lo que favorece la disminución de los niveles sistémicos de insulina. Sin embargo, al igual que otros mamíferos, en las vacas lecheras se ha documentado un periodo transitorio de resistencia a la insulina en el postparto (De Koster y Opsomer, 2013). Este es un proceso fisiológico que se da en todos los mamíferos, con el objetivo de disminuir la utilización de glucosa por parte de los tejidos periféricos para priorizar la producción láctea. Sin embargo, en el caso de la vaca lechera, esto puede aumentar aún más el BEN comprometiendo la salud y la reproducción postparto.

Por otro lado, el cuadro de insulino resistencia descrito en la vaca lechera presenta elementos similares a los descritos en la diabetes tipo II del humano. Esta última ha sido relacionada con cuadros de obesidad y proinflamatorios, elementos que también resultan importantes en el postparto de la vaca lechera (LeBlanc, 2010).

### IV. 1. 1. Insulina: conceptos generales

La insulina es una hormona peptídica producida en las células beta de los islotes pancreáticos, con un peso molecular cercano a los 6 kDa, y está compuesta por dos cadenas conectadas entre sí mediante puentes disulfuro. Se sintetiza en el retículo endoplasmático rugoso como una *pre-pro-hormona* (11,5 kDa). Tras escindir la secuencia *pre* de la molécula, el péptido restante se denomina *pro-insulina*. La insulina es generada luego de que el péptido C se escinde de la *pro-insulina* mediante endopeptidasas activas en el aparato de Golgi y en gránulos secretorios inmaduros. La molécula de insulina resultante consiste en una cadena A (21 aminoácidos) y una cadena B (30 aminoácidos), con tres puentes disulfuro que las mantienen unidas: dos entre las cadenas A y B, y uno en la propia cadena A (Poretsky *et al.*, 1999) (Figura 20).

La secreción de insulina hacia el espacio extracelular se realiza por exocitosis, desencadenada por estímulos específicos. La hormona tiene una vida media corta (de 4 a 10 minutos) y es degradada por la insulinaasa en el hígado (principalmente), riñón y otros tejidos.

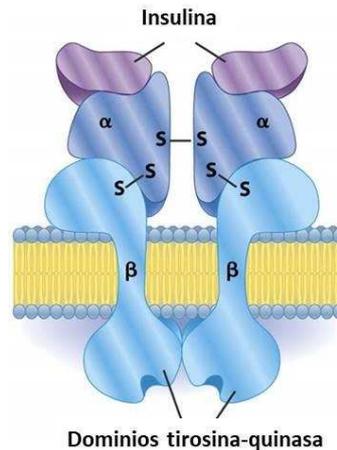


**Figura 20.** Esquema de la pro-insulina. Adaptado de Funk (2015).

#### IV. 1. 2. Vías de señalización de la insulina

La señalización de la insulina está mediada por una red compleja y altamente integrada que controla varios procesos. La estimulación del receptor de insulina (IR, por sus siglas en inglés) conduce a la activación de *dos vías principales de señalización*: a) vía de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K, por sus siglas en inglés) y b) vía de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK, por sus siglas en inglés). La primera de ellas es la responsable de la mayoría de las acciones metabólicas de la insulina, por lo que es la que se abordará en el presente capítulo.

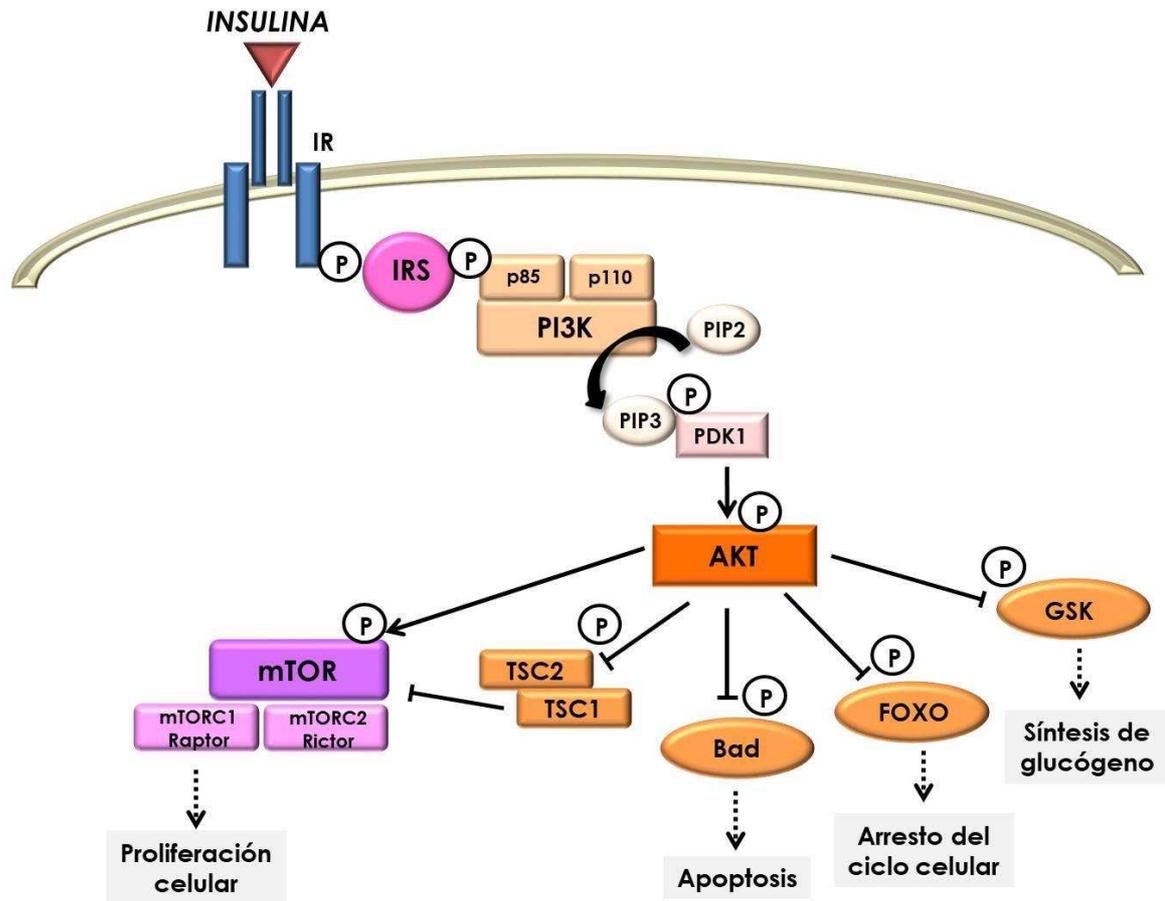
El IR es una glucoproteína integral de membrana de aproximadamente 400 kDa. Se trata de un heterotetrámero con dos subunidades  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$ , todas ellas glucosiladas y unidas entre sí por puentes disulfuro. Las subunidades  $\alpha$  se encuentran en el lado externo de la membrana a las que se une la insulina (Youngren, 2007) (Figura 21). Tras la unión del ligando, el IR experimenta cambios conformacionales que permiten la autofosforilación de los residuos de tirosina localizados en las subunidades  $\beta$  intracelulares. Los residuos de tirosina sirven como sitios de acoplamiento para proteínas llamadas sustratos del receptor de insulina (IRS, por sus siglas en inglés). Se han detectado cuatro IRS diferentes en varios mamíferos (IRS1 a IRS4), siendo la isoforma 1 la que está involucrada en el transporte de glucosa a las células. La proteína IRS1 contiene en su región carboxilo-terminal múltiples sitios de fosforilación de tirosinas que sirven como sitios de unión a la subunidad de la proteína reguladora de la PI3K (Belfiore *et al.*, 2009) (Figura 22). Es importante mencionar que el IRS1 también posee sitios de fosforilación en los residuos de serina, con efectos contrarios a la fosforilación de los residuos de tirosina, que inhiben la vía de señalización (Gual *et al.*, 2005).



**Figura 21.** Esquema del receptor de insulina. Adaptado de Nelson y Cox, (2005).

La PI3K de mamíferos es un heterodímero compuesto por una subunidad catalítica de 110 kDa (p110) y una subunidad reguladora de aproximadamente 85 kDa (p85), y las dos están asociadas de forma no covalente. Una vez acoplado al IRS, PI3K fosforila al fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>, por sus siglas en inglés) produciendo fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>), que a su vez actúa como un segundo mensajero para activar la quinasa dependiente de fosfoinositol 1 (PDK1, por sus siglas en inglés). La PDK1 activada, es capaz de fosforilar la proteína quinasa B, también conocida como Akt.

La Akt es una serina-treonina quinasa que participa corriente abajo en la vía de señalización de PI3K. Es un punto de ramificación clave para la señalización de la insulina (Dupont y Scaramuzzi, 2016). La Akt participa en la mayoría de las acciones metabólicas mediadas por PI3K, a través de la fosforilación de varios sustratos que incluyen otras quinasas, proteínas de señalización y factores de transcripción (Godsland, 2010) (Figura 22).



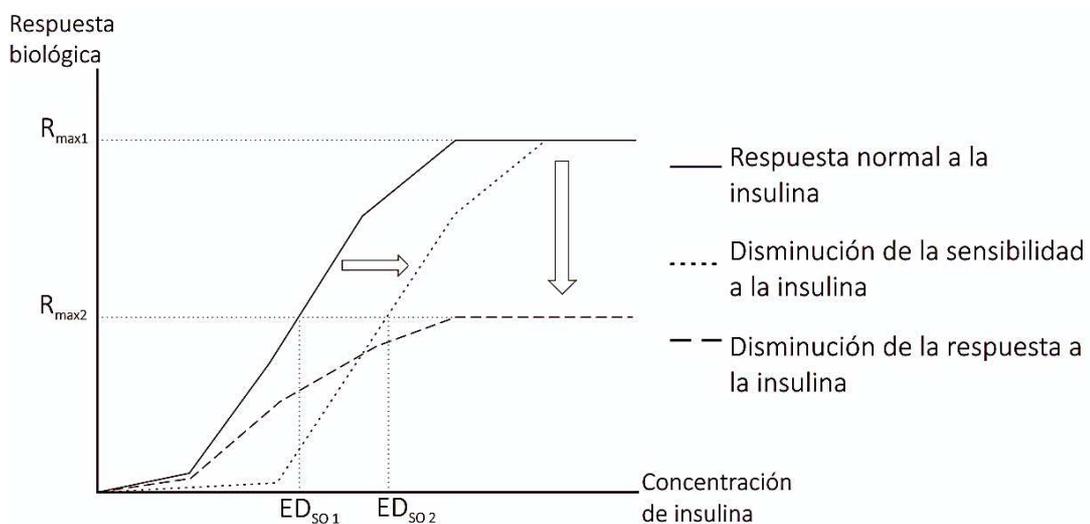
**Figura 22.** Vía de señalización PI3K/Akt activada por el receptor de insulina. Las influencias positivas se muestran mediante líneas que terminan en flechas y las influencias inhibitorias mediante líneas que terminan en barras. Adaptado de (Godsland, 2010).

### IV. 1. 3. Insulina en rumiantes y medicina comparada

Como ya hemos comentado, la mayor parte de los carbohidratos de la dieta se fermentan a AGV por la actividad ruminal, por lo que la cantidad de glucosa que llega al intestino para su absorción resulta mínima. De esta forma el rumiante debe satisfacer sus necesidades generando glucosa mediante gluconeogénesis a partir de otras fuentes, principalmente el propionato. Por otra parte, el rumen permite el paso de alimentos a medida que el tamaño de los mismos disminuye, esto hace que las concentraciones en sangre de los metabolitos absorbidos no varíen de manera abrupta, generando cambios importantes en la regulación metabólica de la insulina en rumiantes, en comparación con los no rumiantes.

En no rumiantes, el principal estímulo para la secreción de insulina es la glucosa, regulando el metabolismo de la misma (Saltiel, 1996). En rumiantes los mecanismos de estimulación de la secreción de insulina parecen ser diferentes, donde los AGV generados en el rumen (principalmente el propiónico), aumentan las concentraciones plasmáticas de insulina

(Relling *et al.*, 2011). A esta particularidad de los rumiantes, en el periparto se suma un estado de insulino resistencia descrito también en otras especies (De Koster y Opsomer, 2013). La resistencia insulínica se define como el estado en que la concentración de insulina produce una respuesta biológica inferior en los tejidos insulino-sensibles (De Koster y Opsomer, 2013; Schoenberg y Overton, 2010). Esto puede deberse a una disminución de la sensibilidad a la insulina (cantidad de hormona requerida para provocar la mitad de la respuesta máxima) o a una disminución de la respuesta a la insulina (máximo efecto de la insulina sobre los tejidos insulino-dependientes) (Figura 23). La resistencia insulínica durante el PT se produce por un descenso tanto en la respuesta como en la sensibilidad a la insulina.



**Figura 23.** Diferencia entre la sensibilidad a la insulina y la respuesta a la insulina.  $R_{max}$ : respuesta máxima.  $DE_{50}$ : Dosis efectiva 50. Adaptado de De Koster y Opsomer (2013).

En humanos la diabetes es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia resultante de defectos en la secreción de insulina, o de la acción de dicha hormona o una combinación de ambas. En la diabetes tipo I hay una destrucción de las células beta del páncreas (en general por causas autoinmunes) con la consecuente disminución o inexistencia de secreción de insulina. En la diabetes tipo II, en una fase temprana, se produce una resistencia a la insulina que el páncreas compensa aumentando la secreción de la misma, dando lugar a una hiperinsulinemia. Si la situación descrita no revierte, las células beta no logran compensar el aumento de la resistencia a la insulina, registrándose un aumento en las concentraciones de glucosa sistémica.

El periodo de insulino resistencia de la vaca lechera postparto posee elementos en común con la diabetes tipo II aunque con importantes diferencias. Esto implica que el

conocimiento en humanos no se pueda trasladar directamente a los rumiantes. Una de las diferencias más importante entre el estado metabólico de personas diabéticas y el de vacas lecheras, es precisamente la concentración de glucosa. Los humanos con diabetes tipo II presentan hiperglucemia, mientras que esto no ocurre en vacas lecheras, ya que la glucosa circulante es captada por la glándula mamaria para la producción de leche, por lo que la glucemia no aumenta (más bien lo contrario).

A su vez, la diabetes tipo II se ha relacionado con el denominado síndrome metabólico caracterizado en humanos, en el que coexiste resistencia insulínica con intolerancia a la glucosa, obesidad, dislipemias, hipertensión arterial, exacerbación de la inflamación y la trombosis. En este sentido, la vaca lechera postparto posee una serie de elementos en común con dicho síndrome, como por ejemplo el cuadro descrito de insulino resistencia. Además, en relación a la obesidad descrita en humanos, son numerosos los trabajos que describen los problemas en vacas con altas CC al parto (Stockdale, 2001; Bobe *et al.*, 2004; Roche *et al.*, 2013b, 2015).

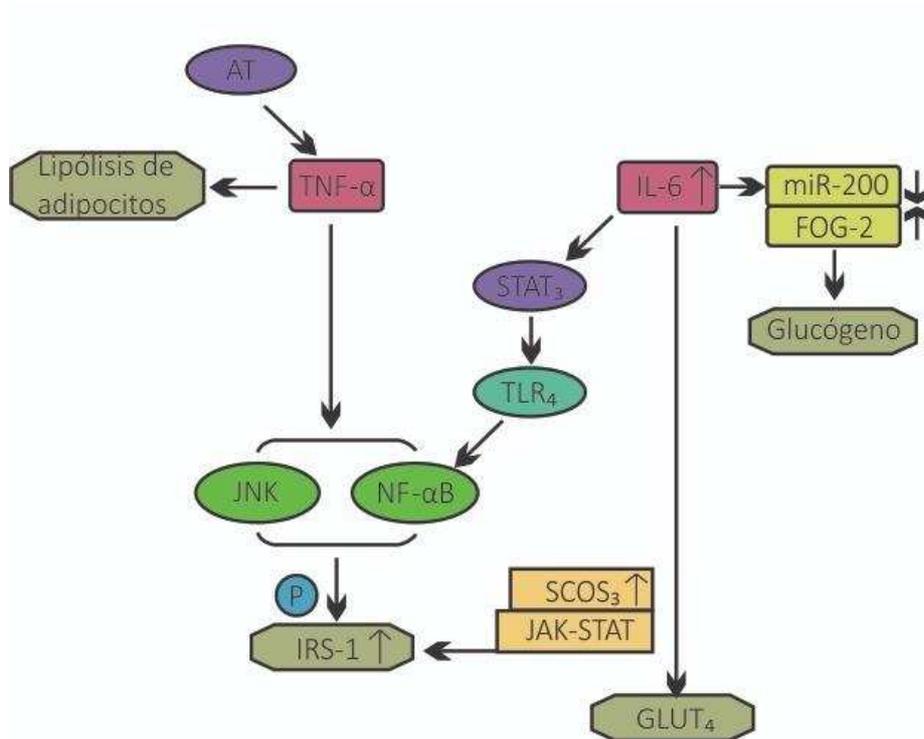
Diversos autores han descrito al postparto de la vaca lechera como un periodo pro-inflamatorio (Bionaz *et al.*, 2007; Bradford *et al.*, 2015). Esto último se ha relacionado con enfermedades infecciosas frecuentes en el periparto, pero también con vacas con alta CC y alta tasa de movilización grasa, en forma similar a lo descrito en humanos (Bertoni y Trevisi, 2013). En este sentido, interleuquinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ , por sus siglas en inglés) y la interleuquina 6 (IL-6) se han indicado como elementos importantes en el desarrollo de dicho estado inflamatorio (Kushibiki, 2011; Trevisi *et al.*, 2012).

#### **IV. 1. 4. TNF $\alpha$ , IL-6 y NF- $\kappa$ B**

El TNF $\alpha$  es una citoquina pro-inflamatoria sintetizada como una proteína transmembrana no glucosilada de 26 kDa, que contiene una secuencia hidrofóbica. Tras una proteólisis, se produce un fragmento de 14 kDa y un fragmento de 17 kDa que es la forma circulante como homotrímero unido de forma no covalente. El TNF $\alpha$  tiene dos tipos de receptores, tipo 1 y tipo 2, que son expresados en muchas células y que ejercen su acción a través de la activación de la vía MAPK o la activación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B, por sus siglas en inglés) (Figura 24).

La IL-6, es una glucoproteína de 21-28 kDa y 184 aminoácidos, con una estructura helicoidal que comparte similitudes con otras citoquinas. Produce sus efectos biológicos a través de un receptor de membrana compuesto por dos subunidades denominadas R-IL-6 y gp 130, que actúa como señal transductora a través de la familia de proteínas tirosina-quinasa Janus (Jak, por sus siglas en inglés). La activación de estas quinasas conduce a la fosforilación

y activación de miembros de la familia de transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT, por sus siglas en inglés) que actúan como factores de transcripción. (Figura 24).

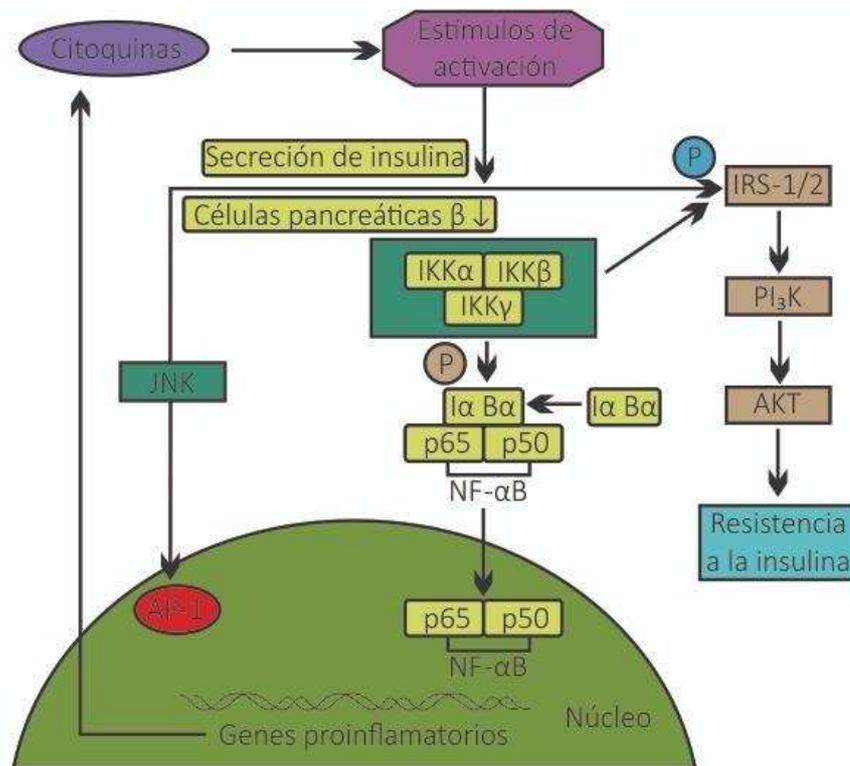


**Figura 24.** Influencia de citoquinas inflamatorias en la resistencia insulínica. Adaptado de Chen *et al.* (2015).

El  $\text{TNF}\alpha$  y la IL-6 son secretados por células del sistema inmunitario como monocitos y macrófagos, linfocitos T y B, células NK, leucocitos polimorfonucleares, y en el hígado por las células de Kupffer (Tateya *et al.*, 2011). También pueden ser secretados por otros tipos celulares como los adipocitos o hepatocitos (Zhou *et al.*, 2016). Las funciones atribuidas a estas dos citoquinas son múltiples, principalmente regulando el sistema inmune. Particularmente se le han atribuido funciones pro-inflamatorias en humanos y en vacas postparto (Kushibiki, 2011; Trevisi *et al.*, 2012). Dicho estado pro-inflamatorio, generado por  $\text{TNF}\alpha$  e IL-6, ha sido relacionado con el desarrollo de insulino resistencia en humanos a través de la activación del NF- $\kappa$ B, y también por medio de MAPK en el caso de  $\text{TNF}\alpha$  (Tateya *et al.*, 2011).

El NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción que participa en la respuesta inmune e inflamatoria entre otras funciones. Forma parte de la familia Rel, constituida por cinco proteínas: p50, p52, p65 (RelA), c-Rel y RelB. La formación del homodímero o heterodímero es determinante en la actividad transcripcional de los promotores en los genes diana. El

heterodímero p50/p65 es el más común y su actividad transcripcional ocurre gracias a la proteína p65. Las proteínas p50 y p52 se sintetizan como precursores p105 y p100, respectivamente, procesados por el proteosoma donde se remueve su extremo carboxilo-terminal dando lugar a las formas activas p50 y p52. El NF- $\kappa$ B se encuentra en el citoplasma en forma inactiva unido a proteínas inhibitoras de  $\kappa$ B (I $\kappa$ Bs) que constituyen una familia estructuralmente relacionada, conformada por I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  e I $\kappa$ B $\epsilon$ . Los inductores de NF- $\kappa$ B, a través de diferentes receptores y proteínas adaptadoras, desencadenan señales que convergen en la activación de la familia de las quinasas de los inhibidores de NF- $\kappa$ B (IKK), constituidos por IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  e IKK $\gamma$ . Los homodímeros o heterodímeros de IKK $\alpha$  o IKK $\beta$  fosforilan a las proteínas I $\kappa$ B induciendo su ubiquitinación y degradación por el proteosoma, permitiendo así la liberación de NF- $\kappa$ B que se transloca al núcleo (Figura 25).



**Figura 25.** Vías que vinculan la inflamación con la resistencia insulínica. Adaptado de Chen *et al.* (2015).

El NF- $\kappa$ B tiene una variedad de activadores, como los que median la respuesta inmune innata y adaptativa, tales como citoquinas pro-inflamatorias (TNF $\alpha$  e IL-1). También se ha descrito una activación por radicales libres de oxígeno y nitrógeno, por medio del IKK $\gamma$ , muy importantes en el postparto de las vacas lecheras (Abuelo *et al.*, 2015). Por su parte, el NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción que regula una gran variedad de genes, tales como citoquinas,

moléculas de adhesión y otras moléculas inmunomoduladoras, en general con acción proinflamatoria (Liu *et al.*, 2017). También se ha visto un efecto en el desarrollo de insulino resistencia en humanos luego de la activación de los IKK (particularmente IKK $\beta$ ), afectando la señalización de insulina a través de la fosforilación de residuos de serina de IRS1 (Chen *et al.*, 2015).

A partir de la estrecha relación de la acción de la insulina con elementos inflamatorios, y la importancia de éstos en el PT de la vaca lechera; el presente capítulo analizará los niveles de expresión proteica hepáticos de elementos de la cascada de señalización PI3K, las citoquinas TNF $\alpha$  e IL-6 y el NF- $\kappa$ B, y algunos parámetros plasmáticos junto al contenido hepático de TG, durante el PT de vacas con diferente CC provenientes de un tambo comercial típico de la zona.

## IV. 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### IV. 2. 1. Animales y toma de muestras

Al igual que en los capítulos anteriores, el estudio que se describe a continuación fue aprobado por el Comité de Ética de la FCV – UNL (Protocolo número 158/2013, Santa Fe, Argentina) y todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con la Guía para el cuidado y uso de animales agrícolas en Investigación y Docencia (Federación de Sociedades de Ciencia Animal, 2010).

Se seleccionaron vacas Holstein ( $n = 16$ ) del mismo tambo comercial que los estudios anteriores, próximas a iniciar su segunda a cuarta lactancia. Catorce días antes de la fecha estimada de parto, se dividieron los animales según lo descrito por Edmonson *et al.* (1989), en vacas con una CC  $\leq 3,25$  y vacas con una CC  $\geq 3,5$ , resultando grupos de Alta CC (ACC,  $n = 7$ ) y Baja CC (BCC,  $n = 9$ ). Sólo se tomaron en cuenta animales sin signos clínicos como placenta retenida, fiebre clínica de la leche, mastitis, metritis, cetosis clínica, abomaso desplazado, cojera y/o trastorno gastrointestinal clínico. Después del parto, las vacas se ordeñaron dos veces al día y la producción de leche se registró mensualmente hasta 120 días en leche con medidores de leche (Waikato Milking Systems, Hamilton, Nueva Zelanda). Las vacas recibieron el mismo alimento que el descrito en estudio II.

Las muestras de sangre e hígado se obtuvieron a los 14 ( $\pm 3$ ) días antes de la fecha prevista de parto y en los días 4 ( $\pm 3$ ), 14 ( $\pm 3$ ) y 28 ( $\pm 3$ ) después del parto (Figura 16). La toma de las muestras, así como su procesado inicial y su conservación se realizó en base a lo descrito en el estudio II.

### IV. 2. 2. Separación de proteínas nucleares y citoplasmáticas

Dadas las implicancias ya explicadas en la activación del NF- $\kappa$ B, se realizó la separación de la fracción nuclear y citoplasmática en las muestras de biopsias hepáticas. Para ello, se siguió el protocolo descrito por Dimauro *et al.* (2012) con modificaciones. Brevemente, se homogenizaron en forma manual, mediante un homogeneizador potter-elvehjem, 100 mg de tejido hepático con 400  $\mu$ l de buffer para extracción de proteínas citoplasmática (EPC) frío conteniendo: Tris-HCl pH 7, 10 mM; Tris-HCl pH 8, 10 mM; NaCl 150 mM; MgCl<sub>2</sub> 5 mM; Ditiotreitól (DTT) 1mM; Triton X-100 0,025% y cócteles inhibidores de proteasa (Pierce Protease Inhibitor Tablets, Thermo Fisher Scientific Company, Finlandia). Luego de dejar reposar en hielo durante 30 min se centrifugó a 800 g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante resultante se centrifugó nuevamente a 12000 g, para obtener un nuevo sobrenadante conteniendo la fracción citoplasmática. El pellet inicial se lo lavó dos veces con el buffer EPC,

centrifugando durante 15 min a 4 °C a 500 g y 1000 g, respectivamente. El pellet final se resuspendió en un buffer para extracción de proteínas nucleares (EPN) frío conteniendo: Tris-HCl pH 7, 10 mM; Tris-HCl pH 8, 10 mM; NaCl 500 mM; KCl 50 mM; EDTA 0,1 mM; Ditiotreitól (DTT) 1mM; Triton X-100 0,025%; glicerol 4% y cócteles inhibidores de proteasa (Pierce Protease Inhibitor Tablets, Thermo Fisher Scientific Company, Finlandia). Luego de dejar reposar en hielo durante 30 min y sonicar, se centrifugó a 12000 g durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante resultante corresponde a la fracción nuclear (Figura 26).

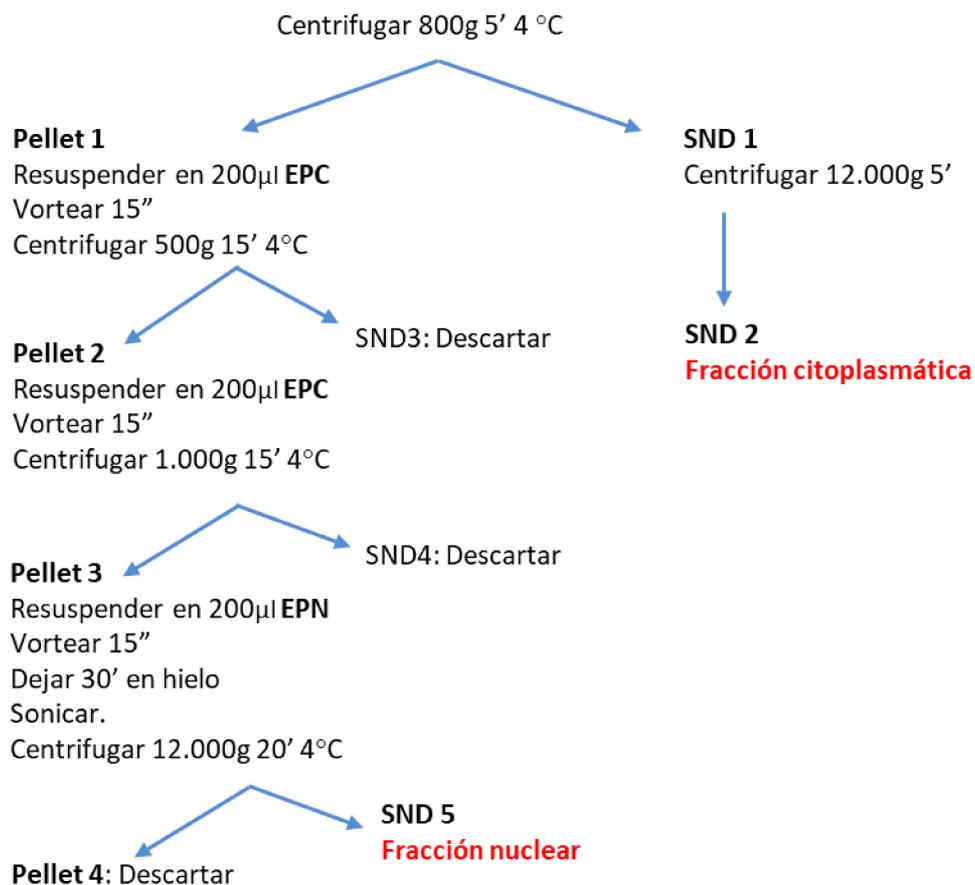


Figura 26. Protocolo de fraccionamiento celular.

#### IV. 2. 3. Determinación de las concentraciones sistémicas de metabolitos y hormonas, contenido hepático de TG y evaluación de la expresión proteica en hígado de vacas

En este capítulo se determinaron las concentraciones plasmáticas de AGNE, BHB, glucosa, TG, insulina e IGF1 y el contenido de TG hepático, según lo descrito en el estudio I.

Por último, la concentración relativa proteica de IR, IRS1, PI3K, Akt y pAkt; IL-6 y TNF $\alpha$ , se realizó mediante análisis Western blot bajo las condiciones generales descritas en el estudio I. En la electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida se utilizó un tamaño de

poro en el gel de resolución del 10% para IR, PI3K, Akt y pAkt; 12% para IL-6 y TNF $\alpha$ , según el peso molecular de las proteínas en estudio. En el caso del IRS1, por el peso de la misma y del control de carga utilizado ( $\beta$ -actina), se utilizó un gel de gradiente 7-15%. Se sembraron 40  $\mu$ g de proteína/línea para la determinación de todas las proteínas, a excepción de TNF $\alpha$  para la cual se optimizaron con 10  $\mu$ g de proteína/línea.

Por último, la determinación relativa de NF- $\kappa$ B se realizó bajo las condiciones generales del resto de las proteínas evaluadas con un gel de resolución de 12%. En cuanto a los controles de carga se utilizó  $\beta$ -actina para la fracción citoplasmática, y el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA, por sus siglas en inglés) para la fracción nuclear.

**Tabla 7.** Anticuerpos y condiciones utilizados en la técnica de Western blot.

<b>Anticuerpo</b>	<b>Tipo</b>	<b>Proveedor</b>	<b>Dilución</b>
<i>Anticuerpo primario</i>			
<b>IR</b>	Rabbit Polyclonal C-19: sc-711	Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA	1/500
<b>IRS1</b>	Rabbit Polyclonal C-20: sc-559	Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA	1/1000
<b>PI3K</b>	Rabbit Polyclonal H-140: sc-98499,	Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA	1/500
<b>Akt</b>	Rabbit Polyclonal ab18785	Abcam, Cambridge, UK	1/600
<b>pAkt</b>	Mouse monoclonal B-5: sc-271966	Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA	1/250
<b>IL-6</b>	Mouse monoclonal 77830, MAB686	Novus Biologicals, LLC , USA	1/500
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Rabbit Polyclonal AHP852Z	Bio-Rad Laboratories Inc California, USA	1/1500
<b>NF-<math>\kappa</math>B p65</b>	Rabbit Polyclonal C-20: sc-372	Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA	1/3000
<b><math>\beta</math>-actina</b>	Mouse monoclonal JLA20	DSHB, Iowa City, IA, USA	1/1500
<b>PCNA</b>	Mouse monoclonal PC10: sc-56	Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA	1/250
<i>Anticuerpo secundario</i>			
<b>Mouse anti-rabbit IgG</b>	Polyclonal sc-2357	Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA	1/10000
<b>Goat anti-mouse IgG</b>	Monoclonal sc-2005	Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA	1/10000

#### IV. 2. 5. Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando el paquete de software estadístico SPSS 22.0 para WINDOWS (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.). La distribución de los datos se realizó para determinar su normalidad utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los datos para la mayoría de las variables no se distribuyeron normalmente. Por lo tanto, para las

determinaciones de sangre, plasma e hígado, se realizó un análisis de medidas repetidas utilizando un MLG con una función de enlace log para las variables con una distribución gamma. Para las variables con resultado de distribución normal, se utilizó un MLG con una función de enlace lineal. El modelo consistió en CC, T y CC × T como efectos fijos, y el animal como efecto aleatorio. Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado significativo. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM.

### IV. 3. RESULTADOS

#### IV. 3. 1. Producción de leche, parámetros plasmáticos y contenido de TG hepáticos

La producción de leche a los 120 días en lactancia fue mayor en el grupo ACC ( $3847 \pm 162$ ) que en el grupo BCC ( $3358 \pm 143$ ;  $p = 0,02$ ). Además, la concentración de AGNE fue mayor en el grupo ACC ( $p < 0,05$ ). La concentración de este metabolito, alcanzó el máximo en el día 4 ( $p < 0,05$ ), manteniéndose alta durante el resto del estudio. No se observó efecto de interacción CC x T ( $p > 0,05$ ). Por su parte, el patrón de concentración de BHB fue similar al de AGNE, aunque el pico de su concentración fue en el día 14 postparto, manteniéndose alta el día 28 ( $p < 0,05$ ). No se observan diferencias de entre grupos ni efecto de interacción ( $p > 0,05$ ), pero existió una tendencia a ser mayor la concentración en el grupo ACC ( $p = 0,09$ ). Por su parte, las concentraciones de glucosa fueron menores el día 4 y 14 en relación al día 28 ( $p < 0,05$ ). Particularmente en este día se observó un efecto de interacción CC x T, donde la concentración de glucosa fue mayor en el grupo ACC ( $p < 0,05$ ). Por su parte los TG plasmáticos mostraron la misma distribución en el tiempo que glucosa ( $p < 0,05$ ), pero sin observarse diferencias entre grupos o efecto de interacción CC x T. Los niveles de insulina disminuyeron en el postparto y se mantuvieron bajos durante todo el ensayo ( $p < 0,05$ ), sin diferencias entre grupos ni efecto de interacción ( $p > 0,05$ ). Por último, el contenido de TG hepático aumento en el postparto ( $p < 0,05$ ), pero sin registrar diferencias entre grupos o efecto de interacción CC x T ( $p > 0,05$ ). (Tabla 8).

**Tabla 8.** CC, concentración plasmática de AGNE, BHB, glucosa, TG, insulina, IGF1 y contenido de TG hepático de vacas lecheras.

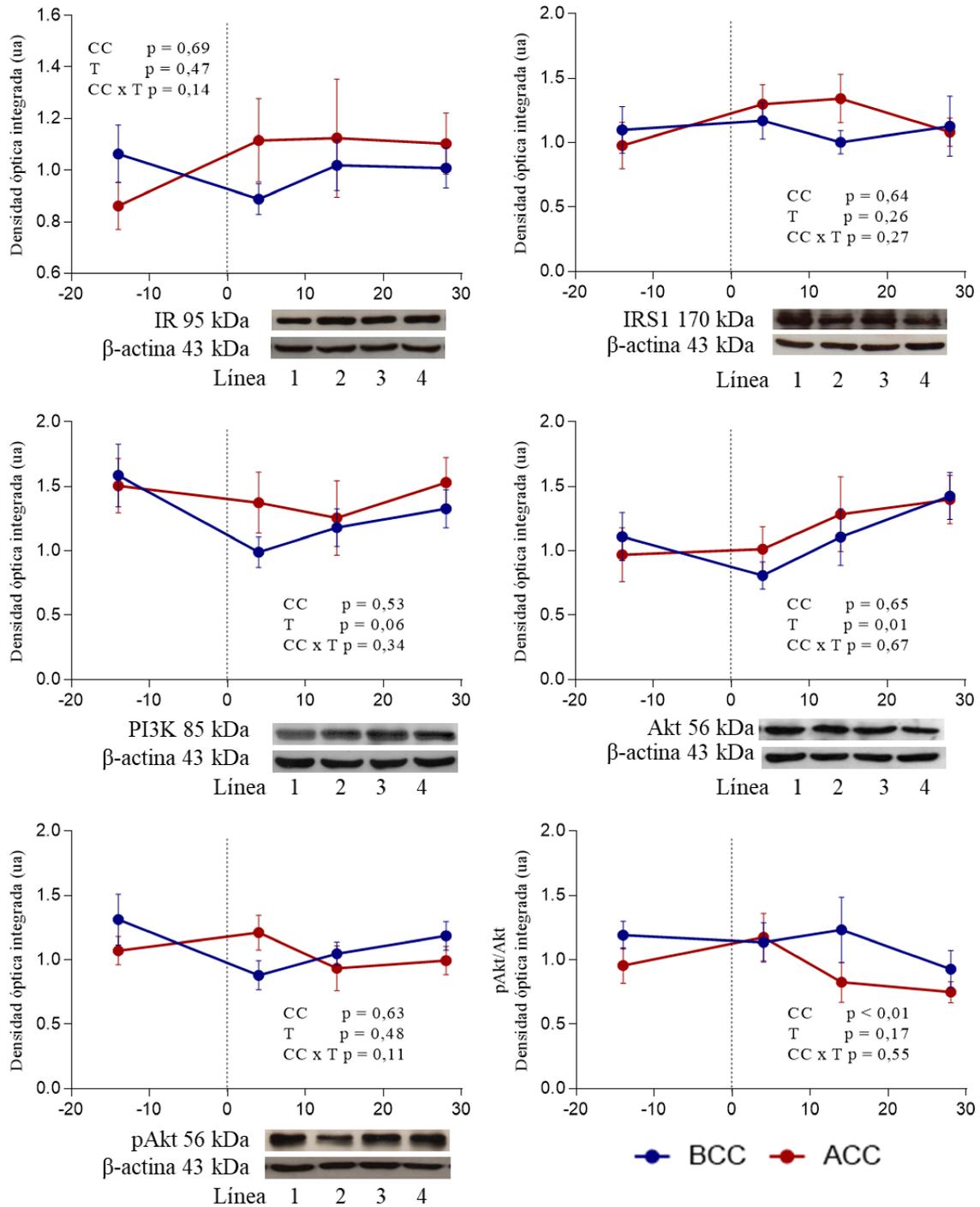
		<i>Días Preparto</i>	<i>Días Postparto</i>			CC	T	CC x T
		-14	4	14	28			
CC	BCC	3,00 ± 0,08	2,83 ± 0,11	2,58 ± 0,10	2,66 ± 0,09	< 0,01	< 0,01	0,25
	ACC	3,71 ± 0,09	3,46 ± 0,14	3,14 ± 0,11	3,00 ± 0,07			
AGNE (mmol/l)	BCC	0,61 ± 0,09	1,32 ± 0,16	1,09 ± 0,16	0,94 ± 0,17	0,05	< 0,01	0,16
	ACC	0,71 ± 0,09	1,30 ± 0,17	1,42 ± 0,23	1,67 ± 0,24			
BHB (mmol/l)	BCC	0,31 ± 0,06	0,70 ± 0,14	0,94 ± 0,19	0,88 ± 0,18	0,09	< 0,01	0,16
	ACC	0,32 ± 0,07	1,07 ± 0,22	1,64 ± 0,34	1,40 ± 0,29			
Glucosa (mg/dl)	BCC	77,65 ± 8,41	78,11 ± 4,46	72,85 ± 4,75	83,70 ± 4,85 <sup>a</sup>	0,57	< 0,01	< 0,01
	ACC	79,17 ± 6,41	73,45 ± 4,12	74,16 ± 4,18	96,16 ± 4,21 <sup>b</sup>			
TG (mg/dl)	BCC	42,40 ± 4,22	33,04 ± 1,72	42,04 ± 5,34	48,20 ± 3,86	0,35	< 0,01	0,82
	ACC	34,71 ± 5,07	29,82 ± 5,54	36,58 ± 4,79	48,68 ± 5,44			
Insulina (ng/ml)	BCC	0,79 ± 0,06	0,65 ± 0,05	0,74 ± 0,08	0,69 ± 0,04	0,42	< 0,01	0,41
	ACC	0,76 ± 0,02	0,69 ± 0,04	0,61 ± 0,04	0,65 ± 0,03			
IGF1 (ng/ml)	BCC	165,39 ± 18,87	121,74 ± 18,94	248,50 ± 31,68	187,57 ± 21,56	0,12	< 0,01	0,18
	ACC	100,37 ± 20,94	96,19 ± 19,20	235,05 ± 34,53	196,94 ± 20,45			
TG Hep (mg/g TH)	BCC	5,38 ± 0,82	17,36 ± 3,14	15,45 ± 3,70	9,60 ± 1,88	0,28	< 0,01	0,22
	ACC	6,50 ± 1,21	16,05 ± 4,50	18,01 ± 2,26	15,83 ± 3,41			

Los animales se agruparon como vacas con Alta Condición Corporal (ACC; n = 7) o Baja Condición Corporal (BCC; n = 8) a los 14 días antes del parto, y a los 4, 14 y 28 días después del parto. TG Hep (mg/g TH): Contenido de TG hepático (mg/g de tejido húmedo). Los valores se expresan como media ± SEM. Se indican los efectos estadísticos de CC, T y CC x T; <sup>a,b</sup>CC x T (p < 0,05) entre CC en una semana determinada.

### **IV. 3. 2. Expresión proteica de IR, IRS1, PI3K, Akt y pAkt; TNF $\alpha$ , IL-6 y NF- $\kappa$ B en hígado**

En cuanto a la expresión de proteicas de la cascada de señalización de insulina evaluadas en este estudio no presentó variaciones en el tiempo, diferencias entre grupos, o efecto de interacción CC x T para IR, IRS1 y PI3K ( $p > 0,05$ ). Por su parte, Akt sólo evidenció efecto durante el tiempo, disminuyendo en el postparto y aumentando luego hasta el día 28 postparto ( $p < 0,05$ ). A su vez, el pAkt sólo evidenció una tendencia en la interacción CC x T ( $p = 0,11$ ). Relacionando estas dos variables, el cociente entre pAkt/Akt total mostró una relación mayor en las vacas del grupo BCC ( $p < 0,05$ ) (Figura 27).

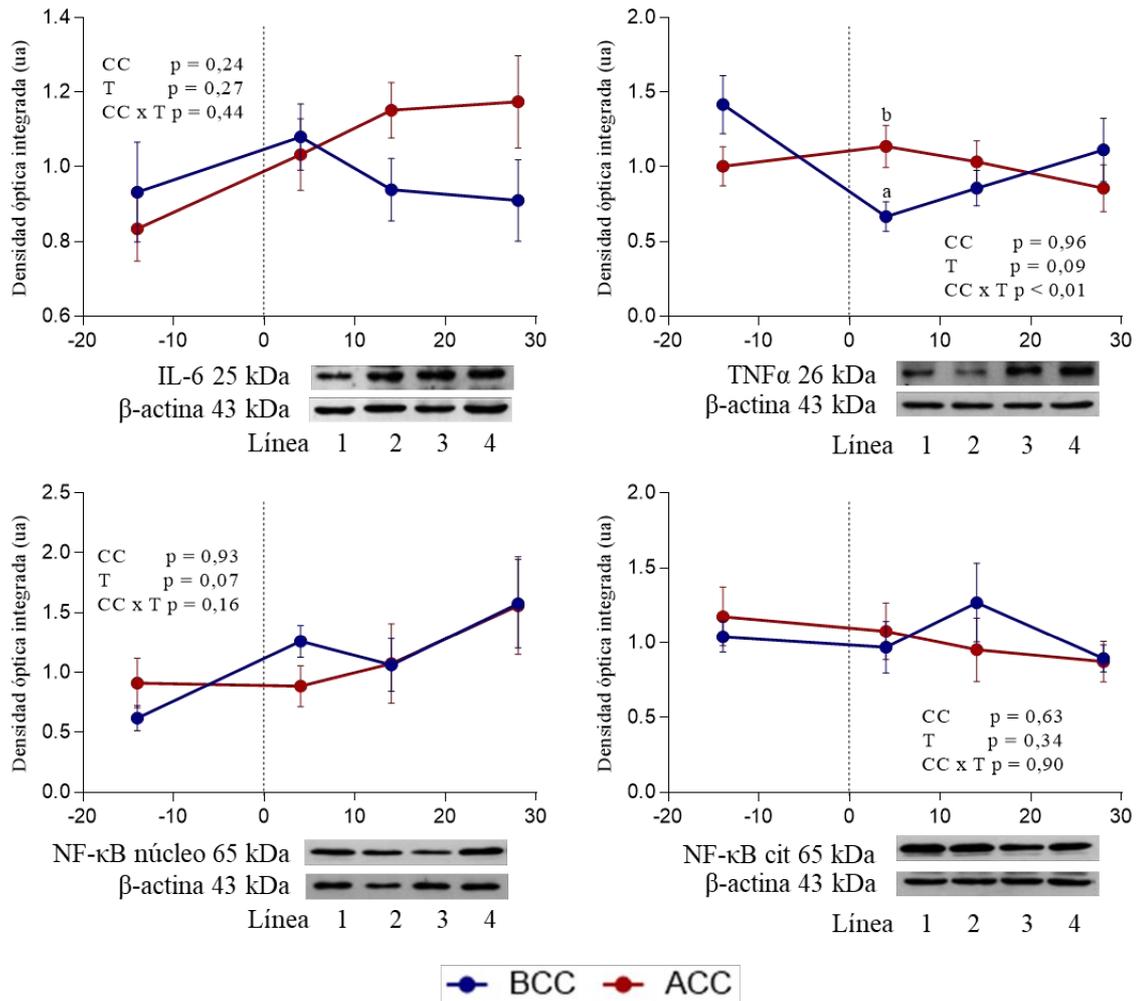
Por otro lado, la evaluación de los mediadores de la inflamación estudiados, no evidenció efecto del tiempo, de la CC o interacción de ellos en la expresión proteica hepática de IL-6 ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, el TNF $\alpha$  mostró un efecto de interacción CC x T, donde en el día 4 postparto la expresión proteica fue mayor en las vacas del grupo ACC ( $p < 0,05$ ). Por su parte, no se observó diferencia entre grupo o efecto interacción en la expresión proteica de NF- $\kappa$ B, tanto en el núcleo como en el citoplasma ( $p > 0,05$ ) (Figura 28).



**Figura 27.** Expresión proteica de IR, IRS1, PI3K, Akt, pAkt y pAkt/Akt en tejido hepático entre el día 14 anterior al parto y el día 28 posterior al parto en animales agrupados como vacas con Alta Condición Corporal (ACC; n = 7) o Baja Condición Corporal (BCC; n = 8);

Parte superior: Densidad óptica integrada (ua: unidades arbitrarias), determinada por Western blot. Los valores representan medias  $\pm$  SEM. Se indican los efectos estadísticos de CC, T y CC x T; <sup>a,b</sup>CC x T ( $p < 0,05$ ) entre CC en una semana determinada

Parte inferior: inmunomarcación representativa. El peso molecular se indica a la derecha. Línea 1: día 14 preparto; líneas 2 a 4: días 4, 14 y 28 postparto.



**Figura 28.** Expresión proteica de IL6, TNFα, N-FκB nuclear y NF-κB citoplasmático en tejido hepático entre el día 14 anterior al parto y el día 28 posterior al parto en animales agrupados como vacas con Alta Condición Corporal (ACC; n = 7) o Baja Condición Corporal (BCC; n = 8);

Parte superior: Densidad óptica integrada (ua: unidades arbitrarias), determinada por Western blot. Los valores representan medias ± SEM. Se indican los efectos estadísticos de CC, T y CC x T; <sup>a,b</sup>CC x T (p < 0,05) entre CC en una semana determinada

Parte inferior: inmunomarcación representativa. El peso molecular se indica a la derecha. Línea 1: día 14 preparto; líneas 2 a 4: días 4, 14 y 28 postparto.

#### IV. 4. DISCUSIÓN

La problemática de la vaca en transición es sin duda una limitante en la producción láctea (Drackley, 1999). En este sentido, la CC es un parámetro muy importante de controlar para disminuir las incidencias de patologías postparto. Vacas con altas CC estas predispuestas a problemas metabólicos e infecciosos (Roche *et al.*, 2009). Habitualmente se buscaba una CC de 3,5 al parto para optimizar la producción de leche, sin embargo, recientemente algunos autores han propuesto que no existen diferencias productivas evidentes entre vacas con 3,0 y 3,5 al parto, y por encima de ese valor aumenta el riesgo de sufrir enfermedades postparto. En función de esta conclusión, las recomendaciones de manejo para el puntaje de CC en vacas lecheras han cambiado, recomendándose una CC de 3,00 a 3,25 al parto (Roche *et al.*, 2007). Es por ello que en este estudio las vacas se dividieron en dos grupos antes del parto con vacas de BCC ( $\leq 3,25$ ) y ACC ( $\geq 3,5$ ). Sin embargo, se encontró diferencia de producción en los animales de mayor CC donde sí se registró una mayor producción láctea. La información en torno al efecto de CC sobre la producción láctea es inconsistente, posiblemente porque la relación no es lineal entre la CC en el parto y la posterior producción de leche, disminuyendo el beneficio a medida que aumenta la CC hasta llegar a un punto donde la producción empieza a disminuir (Roche *et al.*, 2009).

Se ha descrito que las vacas de mayor CC tienden a realizar mayor lipomovilización, perdiendo más CC postparto. En nuestro estudio se determinó que las vacas del grupo ACC perdieron mayor CC que las vacas BCC (0,7 vs 0,3). Si bien todavía se encuentra por debajo de la recomendación de pérdida menor a 1 punto de CC postparto, el periodo de BEN no había finalizado al concluir el muestreo, por lo que las vacas podrían continuar perdiendo peso durante la lactancia. Este efecto estaría relacionado con un menor CMS en vacas de mayor CC, lo que aumentaría el BEN, factor que no podría resolverse a través del incremento de la energía de la dieta según la teoría HOT de regulación del consumo en vacas postparto (Allen *et al.*, 2009). Además de las consecuencias provocadas por la disminución del CMS descrito, se debería sumar el efecto de la mayor producción de leche que aumenta los requerimientos. Se ha mostrado un componente genético en la pérdida de CC, particularmente en el control de la lipólisis, que favorecerían una mayor lipomovilización en las vacas con mayor CC independientemente de las condiciones nutricionales y ambientales (Friggens *et al.*, 2004).

En el presente estudio evaluamos otros parámetros que caracterizan al BEN como AGNE y BHB. La concentración de AGNE fue mayor en las vacas con ACC. En cuanto a BHB se observó una tendencia, donde las concentraciones de BHB tendieron a ser más altas en las vacas del grupo ACC. Además se observó que en las vacas con ACC las concentraciones de

BHB estaban por encima de los valores recomendados el día 14 y 28 postparto (Ospina *et al.*, 2013). Las concentraciones de AGNE en las vacas de ACC, también fueron mayores a las recomendaciones durante todo el postparto. Las altas concentraciones de AGNE y BHB en las vacas del grupo ACC el día 28 indican que dichos animales continúan en BEN y apoyan el supuesto que continuarían perdiendo peso pudiendo alcanzar la pérdida de 1 punto de CC. Al respecto, existe sobrada evidencia que vacas con alta CC al parto y altas concentraciones de AGNE y BHB, presentan mayor riesgo de sufrir trastornos metabólicos y enfermedades infecciosas, comprometiendo la producción láctea y el desempeño reproductivo (Roche *et al.*, 2013b; Barletta *et al.*, 2017). Es importante destacar que en nuestro estudio se tuvieron en cuenta sólo vacas sin registro o evidencia clínica de alguna enfermedad.

Otro metabolito relacionado al BEN es la glucosa, cuyas concentraciones disminuyen en el postparto como consecuencia de la demanda de este precursor por parte de la glándula mamaria para la síntesis de lactosa. En este sentido, trabajos previos han mostrado menores concentraciones de glucosa en vacas con trastornos metabólicos o con menor desempeño reproductivo (Garverick *et al.*, 2013; Bicalho *et al.*, 2017), en relación inversa a las concentraciones de AGNE y BHB. Sin embargo, en nuestro estudio se registró una concentración mayor de glucosa el día 28 postparto, en aquellas vacas con ACC y a pesar de tener parámetros que indican mayor BEN y mayor producción láctea. En este sentido, vacas con excesiva CC se ha asociado a un cuadro de cetosis tipo II, donde la concentraciones de glucosa pueden ser altas o normales, asociadas a un cuadro de insulino resistencia postparto (Mair *et al.*, 2016). Cabe destacar que en nuestro trabajo las vacas del grupo ACC presentaron valores de cetosis subclínica ( $> 1,2$  mmol/l). El cuadro de cetosis tipo II descrito también se ha asociado con valores de insulina mayores a los encontrados en vacas postparto sanas (Mair *et al.*, 2016); sin embargo en nuestro caso no encontramos diferencias en las concentraciones de insulina. A su vez, anteriormente este escenario se ha relacionado directamente con el hígado graso (Herdt, 2000). En nuestro estudio, no se observaron diferencias entre los grupos; sin embargo, en el día 28 postparto los animales del grupo de ACC presentaron un hígado levemente graso (2%) mientras que los animales del grupo BCC presentaron un hígado normal ( $<1\%$ ), de acuerdo a la clasificación de Bobe *et al.* (2004)..

En medicina humana es ampliamente reconocido el cuadro de insulino resistencia relacionado al parto, sin ser del todo claro este efecto ni su importancia en bovinos. Kerestes *et al.* (2009) han descrito una disminución en la reducción de concentración plasmática de glucosa luego de un test de tolerancia a la insulina en el postparto. Considerando la amplia evidencia descrita en humanos sobre la relación entre la obesidad y los problemas en la

regulación de la glucosa, en vacas lecheras se ha reportado una menor respuesta para reducir la concentración sistémica de glucosa luego del tratamiento con insulina comercial, en vacas con mayor CC o con mayores concentraciones de AGNE o BHB (Kerestes *et al.*, 2009; De Koster *et al.*, 2015). Por su parte, Pires *et al.* (2007) observaron que vacas con mayores concentraciones de AGNE requirieron una mayor secreción de insulina para lograr controlar la glucemia luego de la infusión intravenosa de glucosa. En contraposición, se ha observado una relación negativa entre estos la CC, AGNE y BHB con la respuesta al test de tolerancia a la glucosa, pudiendo evidenciar una menor respuesta de la células beta del páncreas (Kerestes *et al.*, 2009; De Koster y Opsomer, 2013). En este sentido, Bossaert *et al.* (2008) mostraron un efecto negativo de las elevadas concentraciones crónicas de AGNE sobre la capacidad secretora de insulina del páncreas. En nuestro caso no hemos realizado pruebas de tolerancia a la glucosa o resistencia a la insulina; sin embargo, como ya hemos descripto anteriormente, se observan valores mayores de glucosa sin que ello pueda ser explicado por una diferencia en la concentración de insulina. En este sentido, Jaakson *et al.* (2018) registraron un aumento en la concentración de glucosa en concordancia con mayores concentraciones de insulina en vacas de ACC asociada a la disminución del transportador GLUT4 en el tejido adiposo.

En el contexto metabólico descripto, en nuestro estudio evaluamos la cascada de señalización de la insulina en el hígado, órgano central en el metabolismo de la vaca lechera en transición. En este sentido, encontramos que la expresión proteica de pAkt tiende a ser mayor en las vacas del grupo BCC, diferencia que se hizo evidente cuando analizamos la relación entre pAkt/Akt. Recordemos que la cascada de señalización de PI3K es una cadena de fosforilaciones donde, una de las más importantes, es la proteína Akt encargada de activar distintas vías según la célula. En los demás elementos de la cascada “corriente arriba” analizados, no encontramos diferencias. Liu *et al.* (2010) han registrado una disminución en la expresión génica del IR en el hígado, pero comparando vacas sanas con vacas cuya concentración mayor de BHB y contenido de TG hepáticos era mayor a la de nuestro estudio. A su vez, como discutimos en el primer estudio, podría haber una regulación postranscripcional del IR que justifique las diferencias encontradas en nuestro trabajo. Por su parte, Zachut *et al.* (2013) evaluaron IR y Akt hepáticos, observando durante un test de tolerancia a la glucosa que su fosforilación estaba determinada por las concentraciones plasmáticas de insulina como parte de los ajustes homeorréticos hacia el parto, y no a un modelo de resistencia a la insulina hepática en vacas periparto. Sin embargo, encontraron respuestas en estas proteínas compatibles con un modelo de resistencia a la insulina en tejido adiposo, antes y después del parto en aquellas vacas con una alta pérdida de peso. En nuestro estudio, la menor activación de Akt en las vacas con ACC

no puede ser explicada por una diferencia en la concentración de insulina. Por lo que podría estar indicando una menor respuesta a la insulina en el tejido hepático en vacas con alta CC.

En humanos, se ha relacionado el estado pro-inflamatorio con la diabetes tipo II y la resistencia insulínica (Chen *et al.*, 2015b). En bovinos, varios investigadores han descrito el PT de la vaca lechera como un periodo pro-inflamatorio, ya sea por el crecimiento y diferenciación de la glándula mamaria, la involución uterina, las posibles infecciones de estos órganos u otros predispuestos por la inmunosupresión propia del parto y/o por traumas que se puedan presentar en el mismo (Trevisi *et al.*, 2011). Además en medicina humana, existen muchas evidencias de la relación entre la obesidad con el aumento asociado en las concentraciones plasmáticas de AGNE y un cuadro inflamatorio crónico, que se caracteriza por la producción anormal de citoquinas pro-inflamatorias como IL-6 y TNF $\alpha$  (Sordillo y Raphael, 2013). Estas citoquinas (además de sus múltiples funciones) tienen la capacidad de generar variaciones en las PFA, sintetizadas principalmente a nivel hepático convirtiéndose en moléculas interesantes para la evaluación de estados inflamatorios. Trevisi *et al.* (2012) ha descrito una relación entre las PFA y la concentración plasmática de IL-6 en vacas lecheras en transición. Por su parte, estudios previos han evaluado la acción inflamatoria, a través de PFA en torno al parto; encontrando relación entre éstas y la performance productiva y reproductiva (Bertoni *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2017). En el capítulo anterior describimos que las vacas que lograron preñarse tuvieron una menor concentración de BilT (Angeli *et al.*, 2019b), que a pesar de no ser una proteína es considerada por algunos autores como análoga a una PFA+ (Bertoni y Trevisi, 2013). En este sentido, también se ha encontrado relación entre la expresión de proteica de TNF $\alpha$  y la IL-6 con la enfermedad quística ovárica (Baravalle *et al.*, 2015).

Diversos estudios han evaluado la producción de citoquinas en la vaca lechera durante el PT, fundamentalmente asociado a enfermedades infecciosas como mastitis y metritis (Hoeben *et al.*, 2000; Dervishi *et al.*, 2016). Sin embargo, no siempre los estadios pro-inflamatorios están asociados a enfermedades infecciosas clínicas (Sordillo y Raphael, 2013). En el nuestro trabajo encontramos un aumento de la expresión proteica de TNF $\alpha$  en el hígado de vacas con ACC, pudiendo estar relacionado con el arribo de mayor cantidad de AGNE y su acción pro-inflamatoria. Es importante destacar que en el hígado existen macrófagos propios del órgano, denominados células de Kupffer, y además se ha descrito la posibilidad de síntesis de citoquinas por parte de los hepatocitos bovinos (Shi *et al.*, 2014, 2015).

Una relación entre el proceso pro-inflamatorio y la resistencia insulínica sería la fosforilación de los residuos de serina del IRS1 por parte de TNF $\alpha$ , NF- $\kappa$ B e indirectamente por

la IL-6 (Chen *et al.*, 2015b). Como ya describimos en la introducción de este capítulo, la fosforilación de los residuos de serina tiene un efecto inhibitor en la señal de insulina, a diferencia de la fosforilación de los residuos de tirosina. En este sentido, Pantelić *et al.* (2018) demostraron una menor fosforilación de los residuos de serina del IRS1 en vacas suplementadas con cromo durante el PT, y la consecuente mayor activación en la vía de señalización de la insulina. A pesar de estos antecedentes, en nuestro estudio no encontramos una mayor expresión de NF- $\kappa$ B en el núcleo, que representa el estado activo de este factor de transcripción. Shi *et al.* (2015) han encontrado incrementos en la activación del NF- $\kappa$ B en hígado de vaca lecheras, pero con mayores niveles de lipidosis hepática que los encontrados en la presente tesis. En ese mismo trabajo se ha descrito una activación en hepatocitos bovinos frente a la estimulación con AGNE. Sin embargo, en otro trabajo se requirió la estimulación con concentraciones de 1,8 mmol/l de BHB (algo superiores a las encontradas por nosotros) para lograr los mismos resultados (Shi *et al.*, 2014). Por otro lado, es importante destacar que los efectos a través del NF- $\kappa$ B no es el único mecanismo por el cual TNF $\alpha$  puede influir sobre la cascada de señalización de la insulina. Se ha descrito también una acción por medio de MAPK sobre la fosforilación del IRS1, la cual no ha sido analizada en nuestro trabajo.

En los últimos años, diversos autores han discutido acerca de las similitudes posibles entre el cuadro de diabetes tipo II y el síndrome metabólico en humanos, y el periparto de la vaca lechera (De Koster y Opsomer, 2013), pero sin arribar a resultados concluyentes. En este contexto, en nuestro trabajo evaluamos vacas con diferentes CC, registrando una mayor lipomovilización en las vacas con mayor CC e incrementos en las concentraciones de AGNE y BHB. Relacionado a esto, encontramos una disminución de la señal de insulina en el hígado en vacas con mayor CC junto a incrementos en la concentración de glucosa, pero sin variación en los niveles de insulina. Por último, relacionado al estado pro-inflamatorio descrito en condiciones de mayor lipomovilización, encontramos una mayor expresión hepática local de TNF $\alpha$ , lo que podría relacionarse con la disminución de la señal de insulina. Sin embargo, como ya mencionamos anteriormente, según antecedentes bibliográficos (Kerestes *et al.*, 2009), se ha descrito una acción de la lipomovilización sobre la secreción de insulina por parte del páncreas. Por lo que es necesario abordar mayores estudios para determinar la magnitud y la importancia de la resistencia insulina en bovinos durante el periparto y las vías metabólicas que se encuentran alteradas. Este conocimiento podría ser de suma importancia para mejorar la adaptación de la vaca lechera postparto, mejorando la productividad de la misma y de los sistemas lecheros.

# **CAPÍTULO V.**

Discusión y Conclusiones finales.

El PT resulta el momento más desafiante de la vida productiva de la vaca lechera, siendo en la actualidad la limitante más importante en la producción láctea. La falta de adaptación a los cambios acontecidos durante esta etapa genera alteraciones metabólicas, infecciosas y reproductivas con importantes pérdidas productivas. En este sentido, los cambios en los requerimientos energéticos junto a la consecuente lipomovilización, son unos de los mayores retos que deben superar la vaca lechera. Los resultados de esta tesis contribuyen al estado actual del conocimiento acerca de la fisiología, particularmente de la adaptación hepática de la vaca en transición.

Durante varios años se ha intentado encontrar respuestas a los interrogantes que surgen sobre los cambios fisiológicos ocurridos cercanos al parto, en especial, mediante el estudio de diferentes metabolitos y hormonas plasmáticas. El devenir de las técnicas de biología molecular, particularmente el estudio del ARNm, ha permitido el desarrollo de estudios genómicos que posibilitaron ampliar el conocimiento sobre los procesos adaptativos en diferentes tejidos. En este trabajo, pudimos analizar la expresión génica junto a la proteica de enzimas relevantes del metabolismo de lípidos en el tejido hepático, aportando una valiosa información que resulta importante cuando no se pueden abordar ensayos para la determinación de la actividad enzimática debido a la poca disponibilidad tejido a partir de biopsias. A su vez, los estudios mediante técnicas de biología molecular como los realizados en esta tesis, son unos de los primeros abordados durante el periparto en sistemas lecheros típicos de Argentina. En este sentido, hemos registrado que vacas Holstein en sistemas pastoriles con suplementación, muestran patrones de lipomovilización similares a las de sistemas más intensivos, lo que puede resultar de utilidad para el desarrollo de nuevas herramientas para sistemas regionales.

La eficiencia reproductiva de los sistemas lecheros es un elemento clave para su productividad. Durante el BEN, la reproducción no es un elemento prioritario para la vaca, por lo que una mejor eficiencia reproductiva puede significar claramente una mejor adaptación a los cambios durante el periparto. Al respecto, se observaron diferencias importantes en la expresión proteica de CPT1 en el hígado, enzima clave de la oxidación mitocondrial de ácidos grasos, y esto se vio asociado a mejoras en los parámetros de funcionalidad y menor contenido de triglicéridos hepáticos. Es importante destacar que estos parámetros de funcionalidad hepática no son muy utilizados en la práctica profesional y podrían resultar una herramienta útil para el diagnóstico a campo además de los clásicos parámetros de BEN, como AGNE y BHB.

Por otro lado, los cambios registrados en la oxidación mitocondrial se dieron en el postparto inmediato, momento más crítico del animal, en concordancia con el aumento de los biomarcadores de lipomovilización analizados en los estudios I y II. Tal es así, que el aumento

en la oxidación mitocondrial registrado en el hígado de vacas con mejor eficiencia reproductiva, sugiere una adaptación del hígado en el postparto inmediato para hacer frente al mayor flujo de AGNE, a diferencia de la oxidación peroxisomal donde los cambios en la expresión proteica fueron registrados posterior al PT (estudio I). Del análisis de estos resultados, surge el interés de evaluar a futuro posibles cambios en estos parámetros a través de manipulaciones dietarias y/o herramientas tecnológicas que promuevan la oxidación hepática de ácidos grasos y que ayuden a las adaptaciones de los animales en el periparto.

Considerando la relación entre la lipomovilización y la resistencia a la insulina, descrita en estudios previos con bovinos y fundamentalmente en humanos y modelos experimentales en animales de laboratorios, y de acuerdo a los resultados obtenidos en los primeros estudios del plan de tesis, en el último estudio evaluamos intermediarios claves de la vía PI3K/Akt de señalización de la insulina. En este sentido, la mayor expresión proteica de pAkt evidenciada en las vacas con menor CC, podría estar relacionada a una menor sensibilidad a la insulina en la vaca lechera postparto, similar a la diabetes tipo II descrito en humanos. Sumado a esto, encontramos que estas alteraciones estaban en concordancia con una menor expresión local de TNF $\alpha$  en el hígado. Indudablemente, el estado proinflamatorio es un elemento sumamente importante en la vaca lechera postparto, pudiendo contribuir en el desarrollo de un cuadro de insulino resistencia junto a la lipomovilización y alta CC, características similares a las atribuidas al síndrome metabólico en humanos. En este sentido, la medicina comparada puede ser una herramienta de mucha utilidad en el desarrollo de modelos que permitan analizar estrategias para incrementar el éxito en la transición de la vaca lechera.

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, la adaptación en el PT es un proceso multifactorial donde intervienen distintos factores, algunos de los cuales fueron evaluados en esta tesis como: productividad, CC, procesos inflamatorios, y otros no evaluados como: estrés oxidativo, hipocalcemia, entre otros. A su vez, en los procesos fisiológicos que intervienen en esta adaptación participan diversas rutas metabólicas; algunas de ellas estudiadas en esta tesis. Por último, es importante destacar que la respuesta de las vacas durante este periodo crítico, frecuentemente suele ser difícil de evaluar ya que puede verse reflejado en una mayor producción, pero también en una mejor respuesta reproductiva (capítulo II) o también en el menor desarrollo de enfermedades que lleven a una mayor sobrevivencia.

Finalmente, el presente trabajo de tesis contribuye con valiosa información sobre la influencia del metabolismo hepático de ácidos grasos, así como alteraciones de la cascada de señalización de insulina y procesos inflamatorios locales que pueden afectar la transición de la

vaca lechera. De esta forma es posible incrementar el conocimiento sobre la fisiología de esta etapa a los fines de mejorar la salud, la eficiencia reproductiva y la productividad de los sistemas lecheros.

# **BIBLIOGRAFÍA**

- Abd Ellah MR, Hussein HA y Derar DR** (2010) Ovarian follicular fluid constituents in relation to stage of estrus cycle and size of the follicle in buffalo. *Veterinary World* **3** 263-267.
- Abdelli A, Raboisson D, Kaidi R, Ibrahim B, Kalem A y Iguer-Ouada M** (2017) Elevated non-esterified fatty acid and  $\beta$ -hydroxybutyrate in transition dairy cows and their association with reproductive performance and disorders: A meta-analysis. *Theriogenology* **93** 99-104.
- Abuelo A, Hernández J, Benedito JL y Castillo C** (2015) The importance of the oxidative status of dairy cattle in the periparturient period: revisiting antioxidant supplementation. *Journal of animal physiology and animal nutrition* **99** 1003-1016.
- Akbar H, Schmitt E, Ballou MA, Corrêa MN, DePeters EJ y Loor JJ** (2013) Dietary lipid during late-pregnancy and early-lactation to manipulate metabolic and inflammatory gene network expression in dairy cattle liver with a focus on PPARs. *Gene Regulation and Systems Biology* **2013** 103-123.
- Akbar H, Grala TM, Vailati Riboni M, Cardoso FC, Verkerk G, McGowan J, Macdonald K, Webster J, Schutz K, Meier S et al.** (2015) Body condition score at calving affects systemic and hepatic transcriptome indicators of inflammation and nutrient metabolism in grazing dairy cows. *Journal of Dairy Science* **98** 1019-1032.
- Albomohsen H, Mamouei M, Tabatabaei S y Fayazi J** (2011) Metabolite composition variations of follicular fluid and blood serum in Iranian dromedary camels during the peak breeding season. *Journal of Animal and Veterinary Advances* **10** 327-331.
- Allen MS** (1996) Physical constraints on voluntary intake of forages by ruminants. *Journal of animal science* **74** 3063-3075.
- Allen MS y Bradford BJ** (2012) Control of food intake by metabolism of fuels: a comparison across species. *The Proceedings of the Nutrition Society* **71** 401-409.
- Allen MS y Piantoni P** (2013) Metabolic control of feed intake. Implications for metabolic disease of fresh cows. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* **29** 279-280.
- Allen MS, Bradford BJ y Oba M** (2009) Board Invited Review: The hepatic oxidation theory of the control of feed intake and its application to ruminants. *Journal of animal science* **87** 3317-3334.

- Andersen JB, Sehested J y Ingvarstsen KL** (1999) Effect of Dry Cow Feeding Strategy on Rumen pH, Concentration of Volatile Fatty Acids and Rumen Epithelium Development. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A - Animal Science* **49** 149-155.
- Andersen JB, Larsen T, Nielsen MO y Ingvarstsen KL** (2002) Effect of energy density in the diet and milking frequency on hepatic long chain fatty acid oxidation in early lactating dairy cows. *Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine* **49** 177-183.
- Angeli E, Trionfini V, Gareis NC, Matiller V, Huber E, Rey F, Salvetti NR, Ortega HH y Hein GJ** (2019a) Protein and gene expression of relevant enzymes and nuclear receptor of hepatic lipid metabolism in grazing dairy cattle during the transition period. *Research in veterinary science* **123** 223-231.
- Angeli E, Rodríguez FM, Rey F, Santiago G, Matiller V, Ortega HH y Hein GJ** (2019b) Liver fatty acid metabolism associations with reproductive performance of dairy cattle. *Animal Reproduction Science* **208** 106104.
- Baravalle ME, Stassi AF, Velázquez MML, Belotti EM, Rodríguez FM, Ortega HH y Salvetti NR** (2015) Altered Expression of Pro-inflammatory Cytokines in Ovarian Follicles of Cows with Cystic Ovarian Disease. *Journal of Comparative Pathology* **153** 116-130.
- Barletta RV, Maturana Filho M, Carvalho PD, Del Valle TA, Netto AS, Rennó FP, Mingoti RD, Gandra JR, Mourão GB, Fricke PM et al.** (2017) Association of changes among body condition score during the transition period with NEFA and BHBA concentrations, milk production, fertility, and health of Holstein cows. *Theriogenology* **104** 30-36.
- Becú-Villalobos D, García-Tornadú I, Shroeder G, Salado EE, Gagliostro G, Delavaud C, Chilliard Y y Lacau-Mengido IM** (2007) Effect of fat supplementation on leptin, insulin-like growth factor I, growth hormone, and insulin in cattle. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire* **71** 218-225.
- Belfiore A, Frasca F, Pandini G, Sciacca L y Vigneri R** (2009) Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocrine Reviews* **30** 586-623.
- Bertoni G y 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.

**Bertoni G, Trevisi E, Han X y Bionaz M** (2008) Effects of Inflammatory Conditions on Liver Activity in Puerperium Period and Consequences for Performance in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* **91** 3300-3310.

**Bertoni G, Trevisi E y Lombardelli R** (2009) Some new aspects of nutrition, health conditions and fertility of intensively reared dairy cows. *Italian Journal of Animal Science* **8** 491-518.

**Bicalho RC, Machado VS y Caixeta LS** (2009) Lameness in dairy cattle: A debilitating disease or a disease of debilitated cattle? A cross-sectional study of lameness prevalence and thickness of the digital cushion. *Journal of Dairy Science* **92** 3175-3184.

**Bicalho MLS, Marques EC, Gilbert RO y Bicalho RC** (2017) The association of plasma glucose, BHBA, and NEFA with postpartum uterine diseases, fertility, and milk production of Holstein dairy cows. *Theriogenology* **88** 270-282.

**Bionaz M y Loor JJ** (2012) Ruminant metabolic systems biology: Reconstruction and integration of transcriptome dynamics underlying functional responses of tissues to nutrition and physiological state. *Gene Regulation and Systems Biology* **2012** 109-125.

**Bionaz M, Trevisi E, Calamari L, Librandi F, Ferrari A y Bertoni G** (2007) Plasma Paraoxonase, Health, Inflammatory Conditions, and Liver Function in Transition Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* **90** 1740-1750.

**Bionaz M, Chen S, Khan MJ y Loor JJ** (2013) Functional Role of PPARs in Ruminants: Potential Targets for Fine-Tuning Metabolism during Growth and Lactation. *Physiological and Nutritional Roles of PPAR across Species* **2013** 28.

**Blanco A** (2013) *Química Biológica*. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina: El Ateneo.

**Bobe G, Young JW y Beitz DC** (2004) Invited Review: Pathology, Etiology, Prevention, and Treatment of Fatty Liver in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* **87** 3105-3124.

**Bossaert P, Leroy JLMR, De Vliegher S y Opsomer G** (2008) Interrelations between glucose-induced insulin response, metabolic indicators, and time of first ovulation in high-yielding dairy cows. *Journal of dairy science* **91** 3363-3371.

- Botham KM y Mayes PA** (2013) Metabolismo de acilgliceroles y esfingolípidos. En *Harper, Bioquímica Ilustrada.*, 29°, pp 229-236. McGraw-Hill.
- Bradford BJ, Yuan K, Farney JK, Mamedova LK y Carpenter AJ** (2015) Invited review: Inflammation during the transition to lactation: New adventures with an old flame. *Journal of Dairy Science* **98** 6631-6650.
- Britt JS, Thomas RC, Speer NC y Hall MB** (2003) Efficiency of Converting Nutrient Dry Matter to Milk in Holstein Herds. *Journal of Dairy Science* **86** 3796-3801.
- Butler WR** (2000) Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Animal reproduction science* **60-61** 449-457.
- Butler S, Marr A, Pelton S, Radcliff R, Lucy M y Butler W** (2003) Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. *Journal of Endocrinology* **176** 205-217.
- Carlson DB, Woodworth JC y Drackley JK** (2007) Effect of l-Carnitine Infusion and Feed Restriction on Carnitine Status in Lactating Holstein Cows. *Journal of Dairy Science* **90** 2367-2376.
- Cattaneo L, Baudracco J, Lazzarini B y Ortega H** (2015) Methodology to estimate the cost of delayed pregnancy for dairy cows. An example for Argentina. *Revista Brasileira de Zootecnia* **44** 226-229.
- Cavestany D, Blanc JE, Kulcsar M, Uriarte G, Chilibroste P, Meikle A, Febel H, Ferraris A y Krall E** (2005) Studies of the transition cow under a pasture-based milk production system: Metabolic profiles. *Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine* **52** 1-7.
- Chapinal N, LeBlanc SJ, Carson ME, Leslie KE, Godden S, Capel M, Santos JEP, Overton MW y Duffield TF** (2012) Herd-level association of serum metabolites in the transition period with disease, milk production, and early lactation reproductive performance. *Journal of Dairy Science* **95** 5676-5682.
- Chen J, Gross JJ, van Dorland HA, Rummelink GJ, Bruckmaier RM, Kemp B y van Knegsel ATM** (2015a) Effects of dry period length and dietary energy source on metabolic status and hepatic gene expression of dairy cows in early lactation. *Journal of Dairy Science* **98** 1033-1045.
- Chen L, Chen R, Wang H y Liang F** (2015b) Mechanisms Linking Inflammation to Insulin

- Resistance. *International journal of endocrinology* **2015** 508409.
- Cherkaoui-Malki M, Surapureddi S, I. El Hajj H, Vamecq J y Andreoletti P** (2012) Hepatic Steatosis and Peroxisomal Fatty Acid Beta-oxidation. *Current Drug Metabolism* **13** 1412-1421.
- Cozzi G, Ravarotto L, Gottardo F, Stefani AL, Contiero B, Moro L, Brscic M y Dalvit P** (2011) Short communication: Reference values for blood parameters in Holstein dairy cows: Effects of parity, stage of lactation, and season of production. *Journal of Dairy Science* **94** 3895-3901.
- Crowe MA, Diskin MG y Williams EJ** (2014) Parturition to resumption of ovarian cyclicity: comparative aspects of beef and dairy cows. *Animal : an international journal of animal bioscience* **8 Suppl 1** 40-53.
- Dann HM y Drackley JK** (2005) Carnitine palmitoyltransferase I in liver of periparturient dairy cows: effects of prepartum intake, postpartum induction of ketosis, and periparturient disorders. *Journal of dairy science* **88** 3851-3859.
- Dann HM, Litherland NB, Underwood JP, Bionaz M, D'Angelo A, McFadden JW y Drackley JK** (2006) Diets during far-off and close-up dry periods affect periparturient metabolism and lactation in multiparous cows. *Journal of dairy science* **89** 3563-3577.
- Dervishi E, Zhang G, Hailemariam D, Goldansaz SA, Deng Q, Dunn SM y Ametaj BN** (2016) Alterations in innate immunity reactants and carbohydrate and lipid metabolism precede occurrence of metritis in transition dairy cows. *Research in Veterinary Science* **104** 30-39.
- Díaz PU, Stangaferro ML, Gareis NC, Silvia WJ, Matiller V, Salvetti NR, Rey F, Barberis F, Cattaneo L y Ortega HH** (2015) Characterization of persistent follicles induced by prolonged treatment with progesterone in dairy cows: An experimental model for the study of ovarian follicular cysts. *Theriogenology* **84** 1149-1160.
- Dimauro I, Pearson T, Caporossi D y Jackson MJ** (2012) A simple protocol for the subcellular fractionation of skeletal muscle cells and tissue. *BMC Research Notes* **5** 513.
- Dirksen GU, Liebich HG y Mayer E** (1985) Adaptive changes of the ruminal mucosa and their functional and clinical significance. *Bovine Pract.* **20** 116-120.
- van Dorland HA, Richter S, Morel I, Doherr MG, Castro N y Bruckmaier RM** (2009) Variation in hepatic regulation of metabolism during the dry period and in early lactation

- in dairy cows. *Journal of Dairy Science* **92** 1924-1940.
- Drackley JK** (1999) ADSA Foundation Scholar Award. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? *Journal of dairy science* **82** 2259-2273.
- Drackley JK, Dann HM, Douglas N, Guretzky NAJ, Litherland NB, Underwood JP y Loor JJ** (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.
- Dupont J y Scaramuzzi RJ** (2016) Insulin signalling and glucose transport in the ovary and ovarian function during the ovarian cycle. *Biochemical Journal* **473** 1483-1501.
- Edmonson AJ, Lean IJ, Weaver LD, Farver T y Webster G** (1989) A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* **72** 68-78.
- Fenwick MA, Fitzpatrick R, Kenny DA, Diskin MG, Patton J, Murphy JJ y Wathes DC** (2008) Interrelationships between negative energy balance (NEB) and IGF regulation in liver of lactating dairy cows. *Domestic Animal Endocrinology* **34** 31-44.
- Foster DW** (2012) Malonyl-CoA: the regulator of fatty acid synthesis and oxidation. *Journal of Clinical Investigation* **122** 1958-1959.
- Friggens NC, Ingvartsen KL y Emmans GC** (2004) Prediction of Body Lipid Change in Pregnancy and Lactation. *Journal of Dairy Science* **87** 988-1000.
- Funk JL** (2015) Trastornos del páncreas endocrino. En *Fisiopatología de la Enfermedad – Una Introducción a la Medicina Clínica*, 7.<sup>a</sup> ed. Eds GD Hammer y SJ McPhee. McGraw-Hill.
- García A y Montiel L** (2011) El periodo de Transición en la Vaca Lechera. *Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente* **11** 152-172.
- Gareis NC, Angeli E, Huber E, Salvetti NR, Rodríguez FM, Ortega HH, Hein GJ y Rey F** (2018) Alterations in key metabolic sensors involved in bovine cystic ovarian disease. *Theriogenology* **120** 138-146.
- Garverick HA, Harris MN, Vogel-Bluel R, Sampson JD, Bader J, Lamberson WR, Spain JN, Lucy MC y Youngquist RS** (2013) Concentrations of nonesterified fatty acids and glucose in blood of periparturient dairy cows are indicative of pregnancy success at first insemination. *Journal of Dairy Science* **96** 181-188.

- Giordano JO, Fricke PM, Wiltbank MC y Cabrera VE** (2011) An economic decision-making support system for selection of reproductive management programs on dairy farms. *Journal of dairy science* **94** 6216-6232.
- Giuliodori MJ, Delavaud C, Chilliard Y, Becú-Villalobos D, Lacau-Mengido I y De la Sota RL** (2011) High NEFA concentrations around parturition are associated with delayed ovulations in grazing dairy cows. *Livestock Science* **141** 123-128.
- Glatz JFC y Luiken JJFP** (2017) From fat to FAT (CD36/SR-B2): Understanding the regulation of cellular fatty acid uptake. *Biochimie* **136** 21-26.
- Godsland IF** (2010) Insulin resistance and hyperinsulinaemia in the development and progression of cancer. *Clinical Science* **118** 315-332.
- Goff JP y Horst RL** (1997) Physiological Changes at Parturition and Their Relationship to Metabolic Disorders. *Journal of Dairy Science* **80** 1260-1268.
- Gohary K, LeBlanc SJ, Lissemore KD, Overton MW, Von Massow M y Duffield TF** (2014) Effect of prepartum administration of recombinant bovine somatotropin on health and performance of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* **97** 6231-6241.
- Gong JG, Lee WJ, Garnsworthy PC y Webb R** (2002) Effect of dietary-induced increases in circulating insulin concentrations during the early postpartum period on reproductive function in dairy cows. *Reproduction (Cambridge, England)* **123** 419-427.
- Graber M, Kohler S, Kaufmann T, Doherr MG, Bruckmaier RM y van Dorland HA** (2010) A field study on characteristics and diversity of gene expression in the liver of dairy cows during the transition period. *Journal of dairy science* **93** 5200-5215.
- Graber M, Kohler S, Müller A, Burgermeister K, Kaufmann T, Bruckmaier RM y van Dorland HA** (2012) Identification of plasma and hepatic parameters related to metabolic robustness in dairy cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **96** 75-84.
- Grum DE, Hansen LR y Drackley JK** (1994) Peroxisomal beta-oxidation of fatty acids in bovine and rat liver. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* **109** 281-292.
- Grummer RR** (1995) Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *Journal of animal science* **73** 2820-2833.
- Grummer RR, Mashek DG y Hayirli A** (2004) Dry matter intake and energy balance in the

- transition period. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* **20** 447-470.
- Grygiel-Górniak B** (2014) Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications - a review. *Nutrition Journal* **13** 17.
- Gual P, Le Marchand-Brustel Y y Tanti JF** (2005) Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* **87** 99-109.
- Hammon HM, Stürmer G, Schneider F, Tuchscherer A, Blum H, Engelhard T, Genzel A, Staufenbiel R y Kanitz W** (2009) Performance and metabolic and endocrine changes with emphasis on glucose metabolism in high-yielding dairy cows with high and low fat content in liver after calving. *Journal of Dairy Science* **92** 1554-1566.
- Han van der Kolk JH, Gross JJ, Gerber V y Bruckmaier RM** (2017) Disturbed bovine mitochondrial lipid metabolism: A review. *Veterinary Quarterly* **37** 262-273.
- Hardwick JP, Eckman K, Lee YK, Abdelmegeed MA, Esterle A, Chilian WM, Chiang JY y Song B-J** (2013) Eicosanoids in metabolic syndrome. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)* **66** 157-266.
- Harrison RO, Ford SP, Young JW, Conley AJ y Freeman AE** (1990) Increased milk production versus reproductive and energy status of high producing dairy cows. *Journal of dairy science* **73** 2749-2758.
- Hein GJ, Bernasconi AM, Montanaro MA, Pellon-Maison M, Finarelli G, Chicco A, Lombardo YB y Brenner RR** (2010) Nuclear receptors and hepatic lipidogenic enzyme response to a dyslipidemic sucrose-rich diet and its reversal by fish oil n-3 polyunsaturated fatty acids. *AJP: Endocrinology and Metabolism* **298** E429-E439.
- Herdt TH** (2000) Ruminant adaptation to negative energy balance. Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice* **16** 215-230.
- Heuer C, Van Straalen WM, Schukken YH, Dirkwager A y Noordhuizen JPTM** (2000) Prediction of energy balance in a high yielding dairy herd in early lactation: model development and precision. *Livestock Production Science* **65** 91-105.
- Hoeben D, Burvenich C, Trevisi E, Bertoni G, Hamann J, Bruckmaier RM y Blum JW** (2000) Role of endotoxin and TNF-alpha in the pathogenesis of experimentally induced coliform mastitis in periparturient cows. *The Journal of dairy research* **67** 503-514.

- Van Hoeck V, Leroy JLMR, Alvarez MA, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Schnorbusch K, Bols PEJ, Leese HJ y Sturmeijer RG** (2013) Oocyte developmental failure in response to elevated nonesterified fatty acid concentrations: Mechanistic insights. *Reproduction* **145** 33-44.
- van Hoeij RJ, Dijkstra J, Bruckmaier RM, Gross JJ, Lam TJGM, Remmelink GJ, Kemp B y van Knegsel ATM** (2017) The effect of dry period length and postpartum level of concentrate on milk production, energy balance, and plasma metabolites of dairy cows across the dry period and in early lactation. *Journal of Dairy Science* **100** 5863-5879.
- Huszenicza G, Janosi S, Kulcsar M, Korodi P, Reiczigel J, Katai L, Peters A y De Rensis F** (2005) Effects of Clinical Mastitis on Ovarian Function in Post-partum Dairy Cows. *Reproduction in Domestic Animals* **40** 199-204.
- Ingvarstsen K., Dewhurst R. y Friggens N.** (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.
- Jaakson H, Karis P, Ling K, Ilves-Luht A, Samarütel J, Henno M, Jõudu I, Waldmann A, Reimann E, Pärn P et al.** (2018) Adipose tissue insulin receptor and glucose transporter 4 expression, and blood glucose and insulin responses during glucose tolerance tests in transition Holstein cows with different body condition. *Journal of Dairy Science* **101** 752-766.
- Jorritsma R, Jorritsma H, Schukken YH y Wentink GH** (2000) Relationships between fatty liver and fertility and some periparturient diseases in commercial Dutch dairy herds. *Theriogenology* **54** 1065-1074.
- Kawashima C, Matsui M, Shimizu T, Kida K y Miyamoto A** (2012) Nutritional factors that regulate ovulation of the dominant follicle during the first follicular wave postpartum in high-producing dairy cows. *The Journal of reproduction and development* **58** 10-16.
- Kerestes M, Faigl V, Kulcsár M, Balogh O, Földi J, Fébel H, Chilliard Y y Huszenicza G** (2009) Periparturient insulin secretion and whole-body insulin responsiveness in dairy cows showing various forms of ketone pattern with or without puerperal metritis. *Domestic Animal Endocrinology* **37** 250-261.

- Kessler EC, Gross JJ, Bruckmaier RM y Albrecht C** (2014) Cholesterol metabolism, transport, and hepatic regulation in dairy cows during transition and early lactation. *Journal of dairy science* **97** 5481-5490.
- Khan MJ, Jacometo CB, Graugnard DE, Corrêa MN, Schmitt E, Cardoso F y Loor JJ** (2014) Overfeeding Dairy Cattle During Late-Pregnancy Alters Hepatic PPAR $\alpha$ -Regulated Pathways Including Hepatokines: Impact on Metabolism and Peripheral Insulin Sensitivity. *Gene regulation and systems biology* **8** 97-111.
- Kleppe BB, Aiello RJ, Grummer RR y Armentano LE** (1988) Triglyceride accumulation and very low density lipoprotein secretion by rat and goat hepatocytes in vitro. *J. Dairy Sci.* **71** 1813-1822.
- van Knegsel ATM, van den Brand H, Dijkstra J, Tamminga S y Kemp B** (2005) Effect of dietary energy source on energy balance, production, metabolic disorders and reproduction in lactating dairy cattle. *Reproduction, nutrition, development* **45** 665-688.
- Kor NNM y Moradi K** (2013) A Review of Biochemical Metabolites Concentration and Hormonal Composition of Ovarian Follicular Fluid in Domestic Animals. *Annual Review & ...* **3** 246-255.
- De Koster JD y Opsomer G** (2013) Insulin resistance in dairy cows. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* **29** 299-322.
- De Koster J, Hostens M, Van Eetvelde M, Hermans K, Moerman S, Bogaert H, Depreester E, Van den Broeck W y 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.
- Kushibiki S** (2011) Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced inflammatory responses in cattle. *Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho* **82** 504-511.
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** 680-685.
- Lean I y DeGaris P** (2010) *Transition Cow management*. Dairy Australia.
- Lean IJ, Saun R Van y DeGaris PJ** (2013) Mineral and antioxidant management of transition dairy cows. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* **29** 367-386.

- LeBlanc S** (2010) Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *The Journal of reproduction and development* **56 Suppl** S29-35.
- Leroy JLMR, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Van Soom A, Bols PEJ y De Kruif A** (2004) Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. *Animal Reproduction Science* **80** 201-211.
- Leroy JLMR, Vanholder T, Opsomer G, Van Soom A y De Kruif A** (2006) The in vitro development of bovine oocytes after maturation in glucose and  $\beta$ -hydroxybutyrate concentrations associated with negative energy balance in dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals* **41** 119-123.
- Leroy JLMR, Vanholder T, Van Kneysel ATM, Garcia-Ispuerto I y Bols PEJ** (2008) Nutrient prioritization in dairy cows early postpartum: mismatch between metabolism and fertility? *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* **43 Suppl 2** 96-103.
- Leroy JLMR, Rizos D, Sturmey R, Bossaert P, Gutierrez-Adan A, Van Hoeck V, Valckx S y Bols PEJ** (2012) Intrafollicular conditions as a major link between maternal metabolism and oocyte quality: A focus on dairy cow fertility. *Reproduction, Fertility and Development* **24** 1-12.
- Li P, Li XB, Fu SX, Wu CC, Wang XX, Yu GJ, Long M, Wang Z y Liu GW** (2012) Alterations of fatty acid  $\beta$ -oxidation capability in the liver of ketotic cows. *Journal of Dairy Science* **95** 1759-1766.
- Li P, Liu Y, Zhang Y, Long M, Guo Y, Wang Z, Li X, Zhang C, Li X, He J et al.** (2013) Effect of non-esterified fatty acids on fatty acid metabolism-related genes in calf hepatocytes cultured in vitro. *Cellular Physiology and Biochemistry* **32** 1509-1516.
- Liu GW, Zhang ZG, Wang JG, Wang Z, Xu C y Zhu XL** (2010) Insulin Receptor Gene Expression in Normal and Diseased Bovine Liver. *Journal of Comparative Pathology* **143** 258-261.
- Liu T, Zhang L, Joo D y Sun S-C** (2017) NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal transduction and targeted therapy* **2**.
- Livak KJ y Schmittgen TD** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* **25** 402-408.
- Loor JJ** (2010) Genomics of metabolic adaptations in the peripartal cow. *Animal* **4** 1110-

1139.

- Loor JJ, Dann HM, Everts RE, Oliveira R, Green CA, Guretzky NAJ, Rodriguez-Zas SL, Lewin HA y Drackley JK** (2005) Temporal gene expression profiling of liver from periparturient dairy cows reveals complex adaptive mechanisms in hepatic function. *Physiological Genomics* **23** 217-226.
- Loor JJ, Dann HM, Guretzky NAJ, Everts RE, Oliveira R, Green CA, Litherland NB, Rodriguez-Zas SL, Lewin HA y Drackley JK** (2006) Plane of nutrition prepartum alters hepatic gene expression and function in dairy cows as assessed by longitudinal transcript and metabolic profiling. *Physiological Genomics* **27** 29-41.
- Loor JJ, Everts RE, Bionaz M, Dann HM, Morin DE, Oliveira R, Rodriguez-Zas SL, Drackley JK y Lewin HA** (2007) Nutrition-induced ketosis alters metabolic and signaling gene networks in liver of periparturient dairy cows. *Physiological genomics* **32** 105-116.
- López-Gatius F, García-Ispuerto I, Santolaria P, Yániz J, Nogareda C y López-Béjar M** (2006) Screening for high fertility in high-producing dairy cows. *Theriogenology* **65** 1678-1689.
- Louet JF, Le May C, Pégorier JP, Decaux JF y Girard J** (2001) Regulation of liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by hormones and fatty acids. *Biochemical Society transactions* **29** 310-316.
- Lucy MC** (2003) Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows. *Reproduction (Cambridge, England) Supplement* **61** 415-427.
- Lucy MC** (2007) Fertility in high-producing dairy cows: reasons for decline and corrective strategies for sustainable improvement. *Society of Reproduction and Fertility supplement* **64** 237-254.
- Mair B, Drillich M, Klein-Jöbstl D, Kanz P, Borchardt S, Meyer L, Schwendenwein I y Iwersen M** (2016) Glucose concentration in capillary blood of dairy cows obtained by a minimally invasive lancet technique and determined with three different hand-held devices. *BMC Veterinary Research* **12** 34.
- Mann S, Leal Yepes FA, Wakshlag JJ, Behling-Kelly E y McArt JAA** (2018) The effect of different treatments for early-lactation hyperketonemia on liver triglycerides, glycogen, and expression of key metabolic enzymes in dairy cattle. *Journal of dairy*

*science* **101** 1626-1637.

- McArt JAA, Nydam D V, Oetzel GR, Overton TR y Ospina PA** (2013) Elevated non-esterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate and their association with transition dairy cow performance. *Veterinary journal (London, England : 1997)* **198** 560-570.
- McCarthy MM, Mann S, Nydam DV, Overton TR y McArt JAA** (2015a) Short communication: Concentrations of nonesterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate in dairy cows are not well correlated during the transition period. *Journal of Dairy Science* **98** 6284-6290.
- McCarthy MM, Yasui T, Ryan CM, Pelton SH, Mechor GD y Overton TR** (2015b) Metabolism of early-lactation dairy cows as affected by dietary starch and monensin supplementation. *Journal of Dairy Science* **98** 3351-3365.
- Mee JF** (2007) The role of the veterinarian in bovine fertility management on modern dairy farms. *Theriogenology* **68 Suppl 1** S257-65.
- Meegalla RL, Billheimer JT y Cheng D** (2002) Concerted elevation of acyl-coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase (DGAT) activity through independent stimulation of mRNA expression of DGAT1 and DGAT2 by carbohydrate and insulin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **298** 317-323.
- Nandi S, Kumar VG, Manjunatha BM y Gupta PSP** (2007) Biochemical composition of ovine follicular fluid in relation to follicle size. *Development Growth and Differentiation* **49** 61-66.
- Nelson DL y Cox MM** (2005) *Lehninger. Principios de Bioquímica*. Barcelona, España: Omega.
- Oetzel GR** (2004) Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* **20** 651-674.
- Oltenu PA y Broom DM** (2010) The impact of genetic selection for increased milk yield on the welfare of dairy cows. *Animal Welfare* **19** 39-49.
- Opsomer G, Gröhn YT, Hertl J, Coryn M, Deluyker H y de Kruif A** (2000) Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: A field study. *Theriogenology* **53** 841-857.
- Ortega HH, Díaz PU, Salvetti NR, Hein GJ, Marelli BE, Rodríguez FM, Stassi AF y Rey**

- F (2016) Follicular Cysts: A Single Sign and Different Diseases. A View from Comparative Medicine. *Current pharmaceutical design* **22** 5634-5645.
- Ospina PA, Nydam DV, Stokol T y Overton TR** (2010a) Associations of elevated nonesterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the northeastern United States. *Journal of Dairy Science* **93** 1596-1603.
- Ospina PA, Nydam D V., Stokol T y Overton TR** (2010b) Evaluation of nonesterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. *Journal of Dairy Science* **93** 546-554.
- Ospina PA, McArt JA, Overton TR, Stokol T y 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.
- Pantelić M, Jovanović LJ, Prodanović R, Vujanac I, Đurić M, Čulafić T, Vranješ-Đurić S, Korićanac G y Kirovski D** (2018) The impact of the chromium supplementation on insulin signalling pathway in different tissues and milk yield in dairy cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **102** 41-55.
- Park W-J, Park J-W, Merrill AH, Storch J, Pewzner-Jung Y y Futerman AH** (2014) Hepatic fatty acid uptake is regulated by the sphingolipid acyl chain length. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1841** 1754-1766.
- Patton J, Kenny DA, McNamara S, Mee JF, O'Mara FP, Diskin MG y Murphy JJ** (2007) Relationships among milk production, energy balance, plasma analytes, and reproduction in Holstein-Friesian cows. *Journal of dairy science* **90** 649-658.
- Pezeshki A, Mehrzad J, Ghorbani GR, Rahmani HR, Collier RJ y Burvenich C** (2007) Effects of short dry periods on performance and metabolic status in Holstein dairy cows. *Journal of dairy science* **90** 5531-5541.
- Pires JAA, Pescara JB y Grummer RR** (2007) Reduction of Plasma NEFA Concentration by Nicotinic Acid Enhances the Response to Insulin in Feed-Restricted Holstein Cows. *Journal of Dairy Science* **90** 4635-4642.
- Poretsky L, Cataldo NA, Rosenwaks Z y Giudice LC** (1999) The insulin-related ovarian

- regulatory system in health and disease. *Endocrine Reviews* **20** 535-582.
- Pullen D, Liesman J y Emery R** (1990) A species comparison of liver triglyceride synthesis and secretion of triacylglycerol from nonesterified fatty acids in media. *Journal of Animal Science* **68** 1395-1399.
- Radcliff RP, McCormack BL, Crooker BA y Lucy MC** (2003) Plasma Hormones and Expression of Growth Hormone Receptor and Insulin-Like Growth Factor-I mRNA in Hepatic Tissue of Periparturient Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* **86** 3920-3926.
- Relling AE y Reynolds CK** (2008) Abomasal infusion of casein, starch and soybean oil differentially affect plasma concentrations of gut peptides and feed intake in lactating dairy cows. *Domestic animal endocrinology* **35** 35-45.
- Relling AE, Pinos Rodriguez JM y Mattioli GA** (2011) Un acercamiento a la relación de las hormonas gastrointestinales con el consumo de alimento en rumiantes. *Agrociencia* **45** 561-572.
- Rhoads RP, Kim JW, Leury BJ, Baumgard LH, Segole N, Frank SJ, Bauman DE y Boisclair YR** (2004) Insulin Increases the Abundance of the Growth Hormone Receptor in Liver and Adipose Tissue of Periparturient Dairy Cows. *The Journal of Nutrition* **134** 1020-1027.
- Rigano D, Sirignano C y Tagliabatella-Scafati O** (2017) The potential of natural products for targeting PPAR  $\alpha$ . *Acta Pharmaceutica Sinica B* **7** 427-438.
- Roche JR, Lee JM, Macdonald KA y Berry DP** (2007) Relationships among body condition score, body weight, and milk production variables in pasture-based dairy cows. *Journal of dairy science* **90** 3802-3815.
- Roche JR, Friggens NC, Kay JK, Fisher MW, Stafford KJ y Berry DP** (2009) Invited review: Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *Journal of Dairy Science* **92** 5769-5801.
- Roche JR, Bell AW, Overton TR y Loores JJ** (2013a) Nutritional management of the transition cow in the 21st century—a paradigm shift in thinking. *Animal Production Science* **53** 1000-1023.
- Roche JR, Kay JK, Friggens NC, Loores JJ y Berry DP** (2013b) Assessing and managing body condition score for the prevention of metabolic disease in dairy cows. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* **29** 323-336.

- Roche JR, Macdonald KA, Schütz KE, Matthews LR, Verkerk GA, Meier S, Loor JJ, Rogers AR, McGowan J, Morgan SR *et al.*** (2013c) Calving body condition score affects indicators of health in grazing dairy cows. *Journal of dairy science* **96** 5811-5825.
- Roche JR, Meier S, Heiser A, Mitchell MD, Walker CG, Crookenden MA, Riboni MV, Loor JJ y Kay JK** (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.
- Royal MD, Darwash AO, Flint APF, Webb R, Woolliams JA y Lamming GE** (2000) Declining fertility in dairy cattle: Changes in traditional and endocrine parameters of fertility. *Animal Science* **70** 487-501.
- Rukkwamsuk T, Geelen MJH, Kruip TAM y Wensing T** (2000) Interrelation of Fatty Acid Composition in Adipose Tissue, Serum, and Liver of Dairy Cows During the Development of Fatty Liver Postpartum. *Journal of Dairy Science* **83** 52-59.
- Saltiel AR** (1996) Diverse signaling pathways in the cellular actions of insulin. *The American journal of physiology* **270** E375-85.
- Sarentonglaga B, Ogata K, Taguchi Y, Kato Y y Nagao Y** (2013) The developmental potential of oocytes is impaired in cattle with liver abnormalities. *The Journal of reproduction and development* **59** 168-173.
- Sartori R, Haughian JM, Shaver RD, Rosa GJM y Wiltbank MC** (2004) Comparison of Ovarian Function and Circulating Steroids in Estrous Cycles of Holstein Heifers and Lactating Cows. *Journal of Dairy Science* **87** 905-920.
- van Saun RJ y Sniffen CJ** (2014) Transition Cow Nutrition and Feeding Management for Disease Prevention. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* **30** 689-719.
- Seifi HA, Gorji-Dooz M, Mohri M, Dalir-Naghadeh B y Farzaneh N** (2007) Variations of energy-related biochemical metabolites during transition period in dairy cows. *Comparative Clinical Pathology* **16** 253-258.
- Selim S, Kokkonen T, Taponen J, Vanhatalo A y Elo K** (2015) Effect of prepartal ad libitum feeding of grass silage on transcriptional adaptations of the liver and subcutaneous adipose tissue in dairy cows during the periparturient period. *Journal of Dairy Science* **98** 5515-5528.

- Sevane N, Armstrong E, Cortés O, Wiener P, Wong RP y Dunner S** (2013) Association of bovine meat quality traits with genes included in the PPARG and PPARGC1A networks. *Meat Science* **94** 328-335.
- Shahzad K, Bionaz M, Trevisi E, Bertoni G, Rodriguez-Zas SL y Loor JJ** (2014) Integrative analyses of hepatic differentially expressed genes and blood biomarkers during the peripartal period between dairy cows overfed or restricted-fed energy prepartum. *PLoS ONE* **9**.
- Shahzad K, Akbar H, Vailati-Riboni M, Basiricò L, Morera P, Rodriguez-Zas SL, Nardone A, Bernabucci U y Loor JJ** (2015) The effect of calving in the summer on the hepatic transcriptome of Holstein cows during the peripartal period. *Journal of Dairy Science* **98** 5401-5413.
- Shi X, Li X, Li D, Li Y, Song Y, Deng Q, Wang J, Zhang Y, Ding H, Yin L et al.** (2014)  $\beta$ -hydroxybutyrate activates the NF- $\kappa$ B signaling pathway to promote the expression of pro-inflammatory factors in calf hepatocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry* **33** 920-932.
- Shi X, Li D, Deng Q, Li Y, Sun G, Yuan X, Song Y, Wang Z, Li X, Li X et al.** (2015) NEFAs activate the oxidative stress-mediated NF- $\kappa$ B signaling pathway to induce inflammatory response in calf hepatocytes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **145** 103-112.
- Smith KL, Butler WR y Overton TR** (2009) Effects of prepartum 2,4-thiazolidinedione on metabolism and performance in transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* **92** 3623-3633.
- Sordillo LM y Raphael W** (2013) Significance of metabolic stress, lipid mobilization, and inflammation on transition cow disorders. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* **29** 267-278.
- Steele MA, Schiestel C, AlZahal O, Dionissopoulos L, Laarman AH, Matthews JC y McBride BW** (2015) The periparturient period is associated with structural and transcriptomic adaptations of rumen papillae in dairy cattle. *Journal of dairy science* **98** 2583-2595.
- Ster C, Loiseau M-C y 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.

- Stockdale CR** (2001) Body condition at calving and the performance of dairy cows in early lactation under Australian conditions: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **41** 823.
- Sundrum A** (2015) Metabolic Disorders in the Transition Period Indicate that the Dairy Cows' Ability to Adapt is Overstressed. *Animals : an open access journal from MDPI* **5** 978-1020.
- Tateya S, Rizzo NO, Handa P, Cheng AM, Morgan-Stevenson V, Daum G, Clowes AW, Morton GJ, Schwartz MW y Kim F** (2011) Endothelial NO/cGMP/VASP Signaling Attenuates Kupffer Cell Activation and Hepatic Insulin Resistance Induced by High-Fat Feeding. *Diabetes* **60** 2792-2801.
- Trevisi E, Amadori M, Bakudila AM y Bertoni G** (2009) Metabolic changes in dairy cows induced by oral, low-dose interferon-alpha treatment. *Journal of Animal Science* **87** 3020-3029.
- Trevisi E, Amadori M, Archetti I, Lacetera N y Bertoni G** (2011) Inflammatory Response and Acute Phase Proteins in the Transition Period of High-Yielding Dairy Cows. En *Acute Phase Proteins as Early Non-Specific Biomarkers of Human and Veterinary Diseases*. Ed F Veas. InTech.
- Trevisi E, Amadori M, Cogrossi S, Razzuoli E y Bertoni G** (2012) Metabolic stress and inflammatory response in high-yielding, periparturient dairy cows. *Research in Veterinary Science* **93** 695-704.
- Tyagi S, Sharma S, Gupta P, Saini A y Kaushal C** (2011) The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research* **2** 236.
- Vailati Riboni M, Meier S, Priest NV, Burke CR, Kay JK, McDougall S, Mitchell MD, Walker CG, Crookenden M, Heiser A et al.** (2015) Adipose and liver gene expression profiles in response to treatment with a nonsteroidal antiinflammatory drug after calving in grazing dairy cows. *Journal of Dairy Science* **98** 3079-3085.
- Valde JP, Lystad ML, Simensen E y Østerås O** (2007) Comparison of Feeding Management and Body Condition of Dairy Cows in Herds with Low and High Mastitis Rates. *Journal of Dairy Science* **90** 4317-4324.
- Varga T, Czimmerer Z y Nagy L** (2011) PPARs are a unique set of fatty acid regulated

transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* **1812** 1007-1022.

- Velazquez MA, Spicer LJ y Wathes DC** (2008) The role of endocrine insulin-like growth factor-I (IGF-I) in female bovine reproduction. *Domestic Animal Endocrinology* **35** 325-342.
- Wang M, Zhou Z, Khan MJ, Gao J y Loor JJ** (2015) Clock circadian regulator (CLOCK) gene network expression patterns in bovine adipose, liver, and mammary gland at 3 time points during the transition from pregnancy into lactation. *Journal of dairy science* **98** 4601-4612.
- Wathes DC** (2012) Mechanisms linking metabolic status and disease with reproductive outcome in the dairy cow. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* **47 Suppl 4** 304-312.
- Wathes DC, Bourne N, Cheng Z, Mann GE, Taylor VJ y Coffey MP** (2007) Multiple correlation analyses of metabolic and endocrine profiles with fertility in primiparous and multiparous cows. *Journal of dairy science* **90** 1310-1325.
- Yen C-LE, Stone SJ, Koliwad S, Harris C y Farese R V.** (2008) Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *Journal of lipid research* **49** 2283-2301.
- Youngren JF** (2007) Regulation of insulin receptor function. *Cellular and Molecular Life Sciences* **64** 873-891.
- Zachut M, Honig H, Striem S, Zick Y, Boura-Halfon S y Moallem U** (2013) Periparturient dairy cows do not exhibit hepatic insulin resistance, yet adipose-specific insulin resistance occurs in cows prone to high weight loss. *Journal of Dairy Science* **96** 5656-5669.
- Zeng J, Deng S, Wang Y, Li P, Tang L y Pang Y** (2017) Specific Inhibition of Acyl-CoA Oxidase-1 by an Acetylenic Acid Improves Hepatic Lipid and Reactive Oxygen Species (ROS) Metabolism in Rats Fed a High Fat Diet. *Journal of Biological Chemistry* **292** 3800-3809.
- Zhao F-Q y Keating AF** (2007) Expression and regulation of glucose transporters in the bovine mammary gland. *Journal of dairy science* **90 Suppl 1** E76-86.
- Zhou Z, Xu M-J y Gao B** (2016) Hepatocytes: a key cell type for innate immunity. *Cellular*

& *Molecular Immunology* **13** 301-315.

**Zhou Z, Trevisi E, Luchini DN y Loor JJ** (2017) Differences in liver functionality indexes in periparturient dairy cows fed rumen-protected methionine or choline are associated with performance, oxidative stress status, and plasma amino acid profiles. *Journal of Dairy Science* **100** 6720-6732.