



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS
BIOLÓGICAS

Tesis para la obtención del título de
Doctor en Ciencias Biológicas

CONTROL HORMONAL DE LA PRODUCCIÓN DE LECHE EN
BOVINOS HOLSTEIN. EFECTOS DE NEMATODIASIS
GASTROINTESTINALES DURANTE EL DESARROLLO DE
TERNERAS Y DISTINTAS ETAPAS REPRODUCTIVAS DE LA
VACA ADULTA

Autor: Adrián F. Perri

Directora: Dra. Isabel Lacau

Codirectora: Dra. Bibiana E. Dallard

Facultad de Ciencias Veterinarias

Laboratorio de Biología Celular y Molecular

Universidad Nacional del Litoral

Dedico esta tesis a la memoria de Alfredo Perri (mi papá) quien en su diario vivir me diera ejemplo de trabajo, esperanza, lucha y alegría incluso en los momentos más duros de la vida.

Agradecimientos

Intentaré resumir escuetamente mi mas profundo agradecimiento para con las personas e instituciones que han colaborado con esta tesis y con mi formación integral.

A mi familia, a mi padre, a mi madre, a mi abuela y a mi hermana, que son quienes me brindaron consejo, ayuda y aliento cuando el ánimo decaía. Sin su apoyo y amor incondicional nunca hubiese llegado a esta instancia. A ustedes GRACIAS!

A mis directoras Isabel Lacau y Bibiana Dallard que confiaron en mí, me guiaron e invirtieron su tiempo, dedicación y experiencia en mi formación.

A Hugo Ortega que aceptó ser codirector de beca colaborando en todo lo que estuvo a su alcance y me abrió las puertas del laboratorio donde finalmente concluí este trabajo.

A la gente de la escuela Inchausti....

A mis queridos amigos con quienes compartí inolvidables momentos y me brindaron su sincera amistad y en quienes siempre encontré una mano tendida, Rubén Carrion, Calos Massi, Matías Moreles, Ariel Valentini y Hugo Martinelli.

A mis compañeros de trabajo quienes colaboraron desinteresadamente en todas las actividades desempeñadas en el campo muchas veces en situaciones climáticas adversas. Néstor Formia, Guadalupe Francia y Martín Miglierina.

A los alumnos de la escuela que colaboraron en actividades de campo y de laboratorio.

A las autoridades, Ricardo Cabassi y Héctor Pérez por su excelente disposición para el desarrollo de las actividades de investigación.

A mis queridos compañeros y amigos del laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias Veterinarias de Esperanza, que desde mi llegada me hicieron sentir parte del mismo. Y quienes me mostraron gestos de solidaridad que nunca olvidaré en el momento más difícil que me tocó vivir: Celina Baravalle, Melisa Velazquez, Ayelén Anweg, Fernanda Rodríguez, Elizabet Pereyra, Sol Rena, Matías Stangaferro, Pablo Díaz, Leandro Neme, Valentina Matiller, Natalia Alfaro, Carolina Panzani, Carolina Andreotti, Natalia Salvetti, Florencia Rey, Bibiana Dallard y Hugo Ortega.

A mis compañeras del IBYME, por brindarme su colaboración, dirección y amistad, Graciela Díaz, Isabel García Tornadu, Carolina Cristina, Ana María Ornstein, Guillermina Luque, Cecilia Ramírez, Victoria Recouvreux, Damasia Becu e Isabel Lacau.

A Luís Calvinho quien tuvo una excelente disposición en mi búsqueda de lugar de trabajo para concluir esta tesis.

A Marcelo Signorini quien aportó su experiencia estadística a este trabajo.

A Laura Marangunich por atender a mis consultas estadísticas.

Al Dr. Eduardo Charreau que me brindó su aval para gestionar el cambio de lugar de trabajo.

A Cesar Fiel por contribuir con mi formación parasitológica.

Al área de posgrado de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral por su excelente disposición para solucionar problemas administrativos.

A mi país que posibilitó mi formación y crecimiento profesional por medio de sus instituciones FBCB-UNL, FCV-UNL, Escuela Inchausti, IBYME-CONICET, y Agencia.

Índice general

Abreviaturas utilizadas	I
Índice de figuras	III
Índice de tablas	VII
Resumen	IX
Abstract	XII

1 Capítulo 1: Introducción	1
1.1 Parasitosis gastrointestinales en bovinos	4
1.1.1 Ciclo Biológico de nematodos gastrointestinales	4
1.1.2 Ecología de la forma de vida libre	5
1.1.3 Interacciones dentro del hospedador	5
1.1.4 Relación inmunitaria hospedador-helminos	6
1.1.5 Regulación por parte del parásito	8
1.1.6 Patología causada en el hospedador	9
1.2 Desarrollo mamario	10
1.2.1 Regulación endocrina del desarrollo mamario	12
1.2.2 Estrógeno y su receptor	12
1.2.3 Hormona de crecimiento (GH), su receptor y hormona efectora	13
1.2.4 Síntesis de IGF-1, su receptor y acción del factor	14
1.2.5 Regulación de la acción de IGF-1 por las IGFBPs	15
1.2.6 Progesterona	15
1.2.7 Vías entrecruzadas	16
1.3 Sistema en estudio.	17
2 Capítulo 2: Objetivos	19
2.1 General	20
2.2 Específicos	20
2.2.1 Sistemas tambo y recría	20
2.2.2 Vacas en producción	20
2.2.3 Recría	20
3 Capítulo 3: Evaluación eco-parasitológica del sistema de tambo en la Escuela Agropecuaria Inchausti.	22
3.1 Objetivo	23
3.2 Materiales y métodos	24
3.2.1 Muestreo de pasturas	24
3.2.2 Muestreo de materia fecal, huevos por gramo (HPG) y cultivo	25
3.2.3 Análisis estadísticos	27
3.2.4 Análisis de los subsistemas	27
3.3 Resultados	27
3.3.1 Subsistema de tambo	27
3.3.1.1 Larvas en la pastura.	27
3.3.1.2 Diversidad de géneros larvales en la pastura	28
3.3.1.3 Huevos en materia fecal	29
3.3.1.4 Larvas producto de cultivo de huevos de nematodos en materia fecal	31

3.3.2	Subsistema de recría	31
3.3.2.1	Larvas en la pastura	31
3.3.2.2	Diversidad	32
3.3.2.3	Huevos por gramo en materia fecal	33
3.3.2.4	Larvas producto de cultivo de huevos de nematodos en materia fecal	34
3.4	Discusión y conclusión	35
3.4.1.1	Subsistema de tambo	35
3.4.1.2	Subsistema de recría	37
4	Capítulo 4: Influencia de los parásitos nematodos en la producción de leche y hormonas relacionadas con la lactancia.	41
4.1	Objetivos	43
4.2	Materiales y métodos	43
4.2.1	Conteo de huevos de nematodos e identificación de géneros.	44
4.2.2	Determinaciones hormonales	45
4.2.3	Análisis estadístico	45
4.3	Resultados	46
4.3.1	HPG en periparto y producción de leche	46
4.3.2	Cuantificación de hormonas relacionadas con la producción de leche	49
4.4	Discusión y conclusión	51
4.4.1	Parásitos	51
4.4.2	Lactancia y HPG	51
4.4.3	Hormonas	53
4.4.4	Conclusión	54
4.4.5	Conclusión de tipo práctico para la producción	55
5	Capítulo 5: Evaluación del efecto tratamiento antiparasitario sobre el desarrollo de la glándula mamaria de terneras Holstein	56
5.1	Objetivos	57
5.2	Materiales y métodos	58
5.2.1	Determinaciones hormonales	58
5.2.2	Evaluación del efecto del tratamiento antiparasitario en la glándula mamaria de terneras Holstein	59
5.2.2.1	Biopsias de glándula mamaria	59
5.2.2.2	Procesamiento del tejido mamario	60
5.2.2.3	Histología (medición de la relación parénquima/estroma)	60
5.2.2.4	Inmunohistoquímica	61
5.2.2.5	Controles	62
5.2.2.6	Análisis de imágenes	62
5.2.2.7	Cuantificación de la inmunomarcación	63
5.2.2.8	Evaluación y cuantificación de la proliferación celular	63
5.2.2.9	Evaluación y cuantificación de proteínas ligadoras de IGF-1 (IGFBP-2 y 3)	64
5.2.2.10	Evaluación y cuantificación de receptores de estrógeno (ER- α)	64
5.2.3	Análisis estadísticos de los datos	66
5.3	Resultados	67
5.3.1	Influencia de los nematodos a nivel sistémico	67
5.3.1.1	Conteo de huevos por gramo en materia fecal	67
5.3.1.2	Evaluación del desarrollo corporal de los grupos experimentales mediante peso corporal	68
5.3.1.3	Concentraciones séricas de IGF-1	68
5.3.1.4	Estado puberal	69
5.3.2	Influencia de los nematodos sobre el desarrollo de la glándula mamaria	70
5.3.2.1	Relación parénquima/estroma	70
5.3.2.2	Proliferación celular mediante expresión de PCNA en tejido mamario	72
5.3.2.3	Expresión de IGFBP-2 en tejido mamario	74
5.3.2.4	Expresión de IGFBP-3 en tejido mamario	75

5.3.2.5	Expresión de receptores de estrógeno alfa (ER- α) en tejido mamario	78
5.3.3	Significancias estadísticas	81
5.4	Discusión y conclusión	82
5.4.1	Nivel sistémico	82
5.4.1.1	Conteo de huevos por gramo y desarrollo corporal	82
5.4.1.2	Niveles séricos de IGF-1 y pubertad	83
5.4.2	Nivel local	84
5.4.2.1	Relación parénquima/estroma y proliferación celular (PCNA)	84
5.4.2.2	Expresión de componentes del sistema de IGF	86
5.4.2.3	Expresión del receptor de estrógeno alfa (ER- α)	88
5.4.3	Conclusión general	90
6	Capítulo 6: Resumen de conclusiones	92
7	Bibliografía	94

Abreviaturas utilizadas

CD4	Cúmulo de diferenciación 4
CD8	Cúmulo de diferenciación 8
DAB	Diaminobenzidina
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ER- α	Receptor de estrógeno tipo alfa
ER- β	Receptor de estrógeno tipo beta
E ₂	17 β -estradiol
GH	Hormona de crecimiento
HPG	Huevos por gramo
IGFBP	Proteína de unión a IGF
IG	Inmunoglobulina
IGF	Factor de crecimiento similar a insulina
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleuquina
L1	Larva primera etapa de desarrollo.
L2	Larva segunda etapa de desarrollo.
L3	Larva infectiva de nematodo
L4	Larva de nematodo en desarrollo intermedio
L5	Larva de nematodo última etapa del desarrollo
LH	Hormona luteinizante
Pp	posparto
RIA	Radioinmunoensayo
RELM β	Resistina similar a molécula β
TDU	Unidad terminal ductal
SEM	Error estándar de la media
TEBs	Botones terminales
T3	Triiodotironina
T4	Tetraiodotironina
Th 1	Células T colaboradoras de tipo 1
Th 2	Células T colaboradoras de tipo 2
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular

Índice de figuras

	Pag.
Figura 1. A: Glándula mamaria de ratón en desarrollo, las flechas señalan a los botones terminales (TEBs) (análogos a TDU en bovinos) que penetran en el tejido graso. B: Unidad terminal ductal (TDU) en bovino. C: Imagen tridimensional de la TDU bovina. D: Esquema de glándula mamaria desarrollada lobule=lóbulillo, alveoli=alvéolos, duct=conducto, gland cistern= cisterna de la glándula, teat cistern=cisterna del pezón, teat=pezón. Figuras A, B y D tomadas de (Capuco y Ellis, 2005).	11
Figura 2. A) La referencia amarilla marca la posición de la escuela M. C. y M. L. Inchausti. Ubicada entre los partidos de 25 de Mayo y 9 de Julio de la provincia de Buenos Aires (Google earth y Inav/Geosistemas SRL, 2012a). B) Imagen de los edificios escolares y los dos subsistemas (tambo y recría) (Google earth y Inav/Geosistemas SRL, 2012b).	18
Figura 3. Embudos para colectado de larvas.	25
Figura 4. Larvas recuperadas de las pasturas. A) Género <i>Cooperia</i> . B) Género <i>Nematodirus</i>	25
Figura 5. A) Huevo de nematodo. B) Cámara de Mac Master conteniendo dilución de materia fecal.	26
Figura 6. Densidad de larvas por kg de materia seca respecto del tiempo.	28
Figura 7. Densidad de larvas por kg de materia seca respecto del tiempo.	29
Figura 8. A) Huevos por gramo en materia fecal del rodeo 1. B) Huevos por gramo en materia fecal del rodeo 2. C) Huevos por gramo en materia fecal de secas y vaquillonas.	30
Figura 9. Positividad al HPG. Representa el porcentaje de animales que presentaron HPG>0 en cada uno de los rodeos.	30
Figura 10. Diversidad de géneros de nematodos presentes en cultivo de materia fecal.	31
Figura 11. Densidad de larvas por kg de materia seca respecto del tiempo (marzo de 2007 a febrero de 2008).	32
Figura 12. Abundancia relativa de géneros larvales presentes en pasturas del sistema de recría.	32
Figura 13. A, B, C) Huevos por gramo (HPG) en materia fecal de los tres grupos de recrías. D: HPG de vaquillonas (se deja constancia que en esta última hay un cambio en la escala del eje de las ordenadas de 10 veces con respecto a los anteriores).	33
Figura 14. Diversidad de géneros larvales en cultivo de materia fecal del sistema de recría.	34
Figura 15. Niveles medios de huevos de nematodos en materia fecal de vacas (n=191) relacionados con los meses en leche. El mes de lactancia cero corresponde al muestreo realizado entre los días 0 y el 29 posparto. Las barras verticales representan el error estándar de la media (SEM). El tiempo promedio de lactancia de vacas fue de 358,5 días \pm 4,8 (SEM).	47

Figura 16. Producción total de leche procedente de vacas agrupadas por su positividad al HPG en torno a la parición. A) Mes=-1: muestra de materia fecal obtenida entre los días -30 a -1, B) mes=0: muestra tomada entre los días 0 a 29, C) mes=-1 y 0: se toman dos muestras, una en el mes -1 y otra durante el mes 0; D) mes=1: corresponde a muestras tomadas desde el día 30 al 59.	47
Figura 17. Tiempos de lactancia de animales negativos y positivos al HPG. Mes -1: muestra de materia fecal obtenida entre los días -30 a -1. Mes 0: muestra tomada entre los días 0 a 29. Mes -1 y 0: se toman dos muestras, una en el mes -1 y otra durante el mes 0. Mes 1: corresponde a muestras tomadas desde el día 30 al 59.	48
Figura 18. Niveles hormonales séricos durante la lactación en vacas con HPG>0, (línea roja) y HPG=0, (línea verde) huevos de nematodos parásitos en la materia fecal en la muestra tomada en el mes 0 (días 0 a 29 posparto). A) GH, B: IGF-1. C) prolactina (Pr1). D) Insulina. Letras minúsculas diferentes indican diferentes concentraciones hormonales a los diferentes tiempos (p< 0,05).	50
Figura 19. Toma de biopsia en una ternera Holstein. A) Introducción de la aguja y disparo del biopsiador. B) Estado del animal posterior a la toma de muestra. C) Muestra de tejido mamario a ser retirada de la aguja de biopsia.	59
Figura 20. A) Biopsia completa de glándula mamaria bovina (X100). B) Unidad ductal terminal (TDU) X 400. El área azul en ambas figuras representa al parénquima mamario mientras que el área rosada-blanquecina corresponde al estroma mamario. Coloración: Hematoxilina/eosina.	61
Figura 21: A) Muestra control negativo de la técnica de inmunohistoquímica, la cual carece de anticuerpo primario. B) Muestra tratada con anti-PCNA. C) Muestra tratada con anti-IGFBP-2. D) Máscara de la imagen -B revela marcación nuclear. E) Máscara de la imagen -D revela marcación citoplasmática. X 400.	65
Figura 22. Evaluación de huevos por gramo (HPG) según la edad en terneras tratadas con antihelmínticos y controles Las barras representan las medias \pm SEM. *Indica p<0,05 para cada período de tiempo.	67
Figura 23. Pesos de los grupos tratados y controles a lo largo de un año. Las barras indican medias \pm SEM. La diferencia entre los mismos se hace significativa a partir del mes 5. *Indica p<0,05.	68
Figura 24. Medias de las concentraciones séricas de IGF-1 a las 20, 30, 40 y 70 semanas de edad de terneras tratadas con antiparasitarios (barra verde) y controles (barra roja) \pm SEM. *Indica p<0.05.	69
Figura 25. Edad promedio de entrada en la pubertad en semanas de los grupos tratados con antihelmínticos (verde) y controles (rojo). Medias \pm SEM. * Indica p=0,02.	69
Figura 26. % de terneras púberes de los grupos tratados con antihelmínticos (verde) y controles (rojo) a las 20, 20 40 y 70 semanas de vida.	70
Figura 27. Biopsias de glándula mamaria de terneras tratadas con atiparasitarios y controles a las 20, 30, 40 y 70 semanas de vida. Coloración: Hematoxilina/eosina. X 200.	71
Figura 28. Porcentaje de parénquima en biopsias de glándula mamaria en animales tratados con antiparasitario y controles sin tratamiento a las 20, 30, 40 y 70 semanas de vida. Las barras representan las medias \pm SEM.	72

Figura 29. Inmunomarcación con anti-PCNA en glándula mamaria de terneras tratadas (izquierda) y controles (derecha) a las 20, 30, 40 y 70 semanas de edad. Las flechas indican núcleos de células PCNA intensamente marcadas (marrón) en el epitelio que reviste las unidades ductales terminales. X 400.	73
Figura 30. Porcentaje de área inmunomarcada con anti-PCNA asociado a parénquima de glándula mamaria de terneras tratadas con antiparasitario y controles sin tratamiento a las 20, 30, 40 y 70 semanas de vida. Las barras representan las medias \pm SEM.	74
Figura 31. Inmunomarcación para IGFBP-2, en terneras tratadas con antiparasitario (izquierda) y controles sin tratamiento (derecha). Biopsias realizadas a las 20, 30, 40 y 70 semanas de vida. X 400.	76
Figura 32. Porcentaje de inmunomarcación con anti-IGFBP-2 a las 20, 30, 40 y 70 semanas de vida. Las barras representan las medias \pm SEM.	77
Figura 33. Inmunomarcación para IGFBP-3, en terneras tratadas con antiparasitario (izquierda) y controles sin tratamiento (derecha). Biopsias realizadas a las 20, 30 y 40 semanas de edad. X400.	77
Figura 34. Porcentaje de inmunomarcación con anti-IGFBP-3 a las 20, 30 y 40 semanas de vida. Las barras representan las medias \pm SEM.	78
Figura 35. Inmunomarcación para receptor de estrógeno α , en terneras tratadas con antiparasitarios (izquierda) y controles sin tratamiento (derecha). Biopsias realizadas a las 20, 30, 40 y 70 semanas de edad. X400. Las flechas indican núcleos de células epiteliales inmunomarcados.	80
Figura 36. Porcentaje de área inmunomarcada con anti-ER- α asociado a parénquima de glándula mamaria de terneras tratadas con antiparasitario y controles sin tratamiento a las 20, 30, 40 y 70 semanas de edad. Las barras representan las medias \pm SEM.	81

Índice de tablas

	Pag.
Tabla 1. Niveles medios de HPG en materia fecal tomada durante la lactancia (meses 1-12) en vacas clasificadas acordes a su positividad al HPG en torno a la parición.	49
Tabla 2. Duración (en días) del intervalo parto al primer servicio (P-PS) y del intervalo parto concepción (P-C) de vacas con conteo de huevos de nematodos en heces y sin huevos en muestras tomadas en torno a la parición. ^a Ambas muestras HPG negativo. ^b Ambas muestras HPG positivo.	49
Tabla 3. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados, sus diluciones de trabajo y su procedencia respectiva y el método de recuperación antigénica empleado en cada caso.	62
Tabla 4. Significancias calculadas para todas las variables analizadas. p_T : significancia del efecto tratamiento. p_{iT} : significancia del efecto tiempo para el grupo tratado. p_{iC} : significancia del efecto tiempo para el grupo control. p_{20} : significancia a la semana 20 de la comparación de tratados y controles. p_{30} : significancia a la semana 30 de la comparación de tratados y controles. p_{40} : significancia a la semana 40 de la comparación de tratados y controles. p_{70} : significancia a la semana 70 de la comparación de tratados y controles. F=Friedman, M-W=Mann-Whitney	81

Resumen

En el presente trabajo se evaluó la influencia de las parasitosis gastrointestinales sobre aspectos productivos de bovinos Holstein, investigando los mecanismos fisiológicos involucrados. Con este propósito se evaluaron parámetros productivos, de desarrollo corporal y de desarrollo mamario y se determinaron variables endócrinas y receptores específicos.

Como primer punto se caracterizó parasitológicamente el sistema de estudio, con una exploración detallada a lo largo del tiempo. En el tambo de la escuela agropecuaria M. C. y M. L. Inchausti (prov. Bs. As.), se identificaron los géneros de nematodos presentes, la oferta larvaria, la dinámica poblacional anual y la prevalencia de parásitos en las distintas categorías de bovinos presentes. El impacto de los nematodos se evaluó en vacas adultas (Subsistema tambo, vacas en producción) y en terneras en desarrollo (Subsistema recría). En el primer caso se evaluó la producción de leche y la concentración de hormonas involucradas en la lactogénesis y en el segundo, la influencia parasitaria sobre parámetros de desarrollo mamario en relación con las alteraciones hormonales encontradas.

Con el propósito de evaluar la oferta parasitaria en el lugar de trabajo se realizaron muestreos quincenales de las pasturas donde pastaban los rodeos, a lo largo de un año, se colectaron las larvas de nematodos, se identificaron (según género) y se cuantificaron. Los géneros representados en el sistema fueron, *Cooperia*, *Ostertagia*, *Oesophagostomun*, *Nematodirus*, *Trichostrongylus*, siendo *Cooperia* el género dominante en el subsistema recría y *Ostertagia* el subsistema tambo, durante todo el año.

A todas las vacas del subsistema tambo (n=265) se les tomaron, mensualmente durante dos años, muestras de materia fecal para conteo de huevos de nematodos por gramo de heces (HPG). Se realizaron, durante el primer año, cultivos de huevos con el objetivo de identificar y cuantificar las larvas parásitas. Un estudio similar se realizó en el subsistema recría (n=450), incluyendo cultivos e identificación de larvas, durante doce meses.

Los resultados de los cultivos de huevos en materia fecal informaron que en tambo *Ostertagia* fue el género más abundante mientras que en recría *Cooperia* resultó ser dominante, en coincidencia con la prevalencia larvaria de las pasturas. Ambos géneros han sido reportados como los más patogénicos para bovinos, y los resultados concuerdan con lo esperado para la zona de trabajo.

A las vacas en producción (N=180) se les midió individualmente el volumen diario de leche producida y se les tomó muestras de sangre para determinación de concentraciones de las siguientes hormonas relacionadas con la lactancia: hormona de crecimiento (GH), factor de crecimiento similar a insulina de tipo 1 (IGF-1), prolactina e insulina.

Las vacas que resultaron positivas al control parasitológico (HPG>0) durante el periparto (meses -1 y 0, siendo mes 0 el mes desde el día del parto al día 29 posparto) produjeron un volumen anual de leche significativamente inferior que las negativas (HPG=0). Esta merma en producción estuvo acompañada por menores valores séricos de GH, IGF-1 y prolactina durante la lactancia, siendo todas hormonas responsables de la distribución homeorréctica de nutrientes y la regulación de la actividad secretora de la glándula mamaria.

En el subsistema de recría se generaron dos grupos de 20 individuos cada uno (con 4 réplicas una por cada estación del año), uno tratado con antiparasitarios sistemáticamente desde el nacimiento y otro control, sin tratamiento. Todas las terneras fueron pesadas mensualmente y se les tomaron, en cada oportunidad, muestras de materia fecal para control parasitológico y muestras de sangre para

determinaciones de hormonas relacionadas con el crecimiento y el desarrollo (IGF-1 y progesterona). Por otra parte, se tomaron biopsias seriadas a 3 individuos de cada grupo experimental (realizado para todas las replicas) a las 20, 30, 40 y 70 semanas de vida, para determinar la posible influencia de la presencia de nematodos en el desarrollo de la glándula mamaria. En estas muestras se determinaron los siguientes parámetros: relación parénquima/estroma, proliferación celular, proporción de receptores de estrógeno de tipo α (ER- α) y proporción de proteínas de unión a IGF de los tipos 2 y 3 (IGFBP-2 y -3). A las 70 semanas se midió el área pélvica de las terneras.

Las terneras tratadas con antiparasitarios, presentaron mayor peso corporal, adelantamiento puberal, mayor área pélvica y mayor concentración sérica de IGF-1, corroborando resultados anteriores de nuestro laboratorio. El tejido mamario de las terneras tratadas resultó tener una mayor relación parénquima/estroma, una mayor proliferación celular, una mayor proporción de ER- α y una menor proporción de IGFBP-2 que el de las terneras sin tratar.

El menor desarrollo mamario presentado por las terneras controles podría estar mediado sistémicamente por la menor concentración de IGF-1, que a su vez podría estar afectando la concentración de los receptores de estradiol, hormona indispensable para el desarrollo mamario en la etapa puberal. Además, el aumento de IGFBP-2 intramamario podría generar el secuestro de parte del IGF-1, dejando menos factor de crecimiento biodisponible, efecto que se sumaría a la deficiencia sistémica observada. El conjunto de estas situaciones (menor IGF-1 sistémico y biodisponible, menor concentración de los receptores de estradiol) explicaría los parámetros diferenciales de crecimiento entre los grupos experimentales.

Como conclusión general de este trabajo podríamos decir que la energía redireccionada hacia el desarrollo y la reproducción de los parásitos causa, en vacas, una disminución de su producción de leche y, en terneras, un menor desarrollo de la glándula mamaria, el cual es consistente con un retraso en el desarrollo general de los animales afectados. Todos estos efectos estarían mediados, al menos en parte, por alteraciones en el sistema regulatorio endocrino del hospedador.

Abstract

In the present work the influence of the gastrointestinales parasitisms was evaluated on productive aspects of Holstein bovines, investigating the involved physiological mechanisms. With this intention were evaluated, productive parameters, corporal parameters and mammary gland development parameters and endocrine variables and specific receptors were determined. As first point parasitological characteristics of system (in study) were determined, with an exploration detailed throughout the time. In the dairy farm of school M. C. and M. L. Inchausti (Buenos Aires province.), the genus of nematodes were identified, the larval offer, annual population dynamics and the prevalence of parasites in the different categories from bovine presents were identified.

The impact of the nematodes was considered in adults cows (dairy factory's subsystem, cows in production) and in developing heifer calves (yearling heifer's subsystem).

In the first case the milk production was evaluated and hormones related to lactogenesis were measured in serum. In the second case, the influence of the presence of nematodes on mammary developmental parameters was considered, and was related to the hormonal alterations.

With the purpose of evaluating the parasitic offer of the work site, samplings of the pastures (performed every two weeks) were taken where herds grazing. Nematode larvae were collected, then identified (according to genera) and quantified.

With respect to diversity, the genera represented in the system were *Cooperia*, *Ostertagia*, *Oesophagostomum*, *Nematodirus*, *Trichostrongylus*. According to the abundance, the dominant genera in all the system were *Cooperia* and *Ostertagia* at spatial (both subsystems) and temporal (during the year) levels. The first was dominant in the yearling heifer's subsystem whereas the second was dominant in the dairy factory's subsystem.

All the cows in the dairy factory's subsystem (n=265) were monthly sampled for feces during two years for counting egg per gram (EPG). During the first year, egg cultures with the intention of identifying and quantifying parasitic larvae, were performed. The study was similar for the yearling heifer's subsystem (n=450), including cultures and identification of larvae, during twelve months.

The results of the egg cultures in fecal matter informed that *Ostertagia* was the most abundant in dairy farm and in breeding *Cooperia* became dominant, in coincidence with the larval prevalence of the pastures. Both sorts have been reported like most pathogenic for bovines, and the results agree with the expected for the zone of work.

Milk production was individually and daily measured to all cows in production (n=180) and blood samples for determination of hormonal concentrations related to the lactation (GH, IGF-1, prolactin and insulin) were monthly taken to all of them.

The positive cows to the parasitological control during peripartum (month -1 and 0, being month 0 the month from the day of the parturation to day 29 postparturation), produced an annual volume of milk significantly lower than negative cows (EPG=0).

This decrease in production was accompanied by smaller séricos values by GH, IGF-1 and prolactina during lactation, being all hormones responsible for the homeorrection distribution of nutrients and the regulation of the secretory activity of the mammary gland.

In the yearling heifer's subsystem two groups of heifer calves (with 4 replicates one by each station of the year) were randomly generated. One was systematically treated, from birth onward, with antiparasitics drugs (n=20) and the other was left without treatment, as control (n=20).

All the calves were weighed monthly and, in each opportunity, samples of feces for parasitological control, and blood for hormone determinations, (IGF-1 and progesterone), were taken.

On the other hand, serial biopsies to 3 individuals were taken from each experimental group (made for all replies) at 20, 30, 40 and 70 weeks of life, to determine the possible influence of the presence of nematodes in the development of the mammary gland. In these samples the following parameters were determined: parenchyma/stroma rate, cellular proliferation, proportion of estrogen receptors α and proportion of IGFBP-2 and -3.

The calves treated with antiparasitic drugs, had greater body weight, puberal advancement, greater pelvic area and higher serum concentration of IGF-1 (in agreement with previous results from our laboratory). The mammary tissue of the treated calves had greater parenchyma/stroma rate, higher cellular proliferation rate, greater proportion of estrogen receptors α and a smaller proportion of IGFBP-2 comparing with untreated heifers.

The lesser mammary development presented by the untreated calves could be mediated systemically by smaller concentration of IGF-1, that could be in turn affecting the concentration of the estrogens receptors, as estrogens and IGF-1 are both essential for pubertal mammary development. Furthermore, the intramammary increase of IGFBP-2 could capture part of IGF-1, leaving less growth factor bioavailable. All these situations together (lower systemic and bioavailable IGF-1, and lower concentration of the estrogens receptors) could explain the differential parameters of mammary development between the experimental groups.

As general conclusion of this work, we can say that the energy redirected towards the development and reproduction of the parasites causes a diminution of milk production in cows, and a smaller development of the mammary gland, which is consistent with a delay in the general development of the affected animals observed, in calves. All these effects would be mediate, at least in part, by alterations in the endocrine regulatory system of the guest.

Capítulo 1: Introducción

Los sistemas rurales de producción son estructuras que resultan de la acción antrópica sobre los sistemas naturales (tanto en sus componentes orgánicos como inorgánicos). Su origen y evolución están asociados a necesidades humanas, fundamentalmente de obtención de alimentos (Sans, 2007). Los componentes del agroecosistema son físicos, como el sustrato geológico, el suelo, el clima o la parcela de cultivo; biológicos, como plantas, animales y microorganismos; y socioeconómicos, como los humanos que lo habitan y/o explotan (Ortíz-Avila, 2008).

En los sistemas naturales, las poblaciones que forman la comunidad interactúan con intercambio de materia y energía (Begon y col., 2006). Esta característica la comparten con los agroecosistemas, pero en este último caso se suma el aporte energético exógeno, por parte del hombre, en pos del mantenimiento del sistema.

La palabra biodiversidad es la forma abreviada de diversidad biológica y fue inicialmente definida como el conjunto de plantas, animales y microorganismos que viven e interaccionan en un ecosistema (Wilson, 1988). También fue definida como: “la diversidad de vida en la tierra en todos sus niveles, desde los genes a los ecosistemas y los procesos ecológicos y evolutivos que lo sustentan” (Gaston, 1996). Son también componentes fundamentales de la biodiversidad los procesos funcionales que derivan de la especialización e interacción entre los individuos (Williams y col., 1996).

Las relaciones entre los seres vivos se conocen como interacciones y pueden ser de tipo intra o interespecíficas y ocurren tanto en los sistemas naturales como en los antrópicos. Las relaciones interespecíficas conocidas son: depredación, simbiosis, comensalismo y parasitismo. Estas relaciones constituyen algunos de los elementos a través de los cuales opera la selección de individuos y que, sin intervención humana, conocemos como selección natural.

El parasitismo está considerado como un caso especial de depredación o consumo. Begon define a los parásitos como “aquel grupo de organismos que obtiene sus nutrientes de uno o de algunos pocos individuos hospedadores, normalmente causando daño pero no la muerte inmediata” (Begon y col., 2006). Por otra parte Haldane, caracterizó a la interacción Hospedador-parásito como una de las mayores fuerzas en ecología y evolución (Haldane, 1949). Se sabe que esta relación es promotora de coevolución entre las especies. Ésta resulta de la evolución de una especie en respuesta a la selección impuesta por una segunda especie, que a su vez es

afectada por la primera especie. De este modo la selección recíproca es un prerrequisito para la coevolución (Clayton y col., 1999).

La relación hospedador-parásito genera en el hospedador un abanico de consecuencias negativas a nivel de estado corporal y eficiencia biológica. En sistemas ganaderos los parásitos provocan cuantiosas pérdidas y las presiones selectivas sobre los parásitos provienen mayormente del manejo humano. Las parasitosis son combatidas por su impacto productivo, por lo que los cambios en los organismos se producen mayormente en una dirección en donde una de las especies cambia más rápidamente que la otra. Un ejemplo de esto es la adaptación que se produce en parásitos sometidos a la presión selectiva de antiparasitarios y que se conoce como resistencia antiparasitaria.

En el presente trabajo se investiga la influencia de parásitos nematodos gastrointestinales en la producción de leche y en el desarrollo de la glándula mamaria de bovinos Holstein.

En los bovinos, la interacción parasitaria ha sido exhaustivamente estudiada en ganado de carne pero no tanto en vacas lecheras. En Argentina, algunos ensayos indican un aumento en la producción de leche del 5% en los animales desparasitados durante la lactancia a intervalos mensuales (Biondani y Steffan, 1988; Fiel y Steffan, 1994). A pesar de estos antecedentes, la postura más difundida entre veterinarios rurales y productores sostiene que las consecuencias de la presencia de nematodos gastrointestinales son escasas o nulas entre animales adultos, por haberse llegado a un equilibrio hospedador-parasito (inmunidad adquirida).

Trabajos de nuestro laboratorio han descripto también consecuencias de las nematodiasis en terneras de raza lechera, las cuales presentaron menor peso corporal, menor área pélvica, retraso puberal y disminución en la concentración sérica de hormonas involucradas en el crecimiento y la regulación de la reproducción (Mejía y col., 1999; Lacau-Mengido y col., 2000).

En el presente trabajo se investigó la influencia de los parásitos nematodos sobre la producción de leche y sobre el desarrollo de la glándula mamaria prepuberal. Es por ello que, a continuación, se desarrollarán dos puntos introductorios que, en apariencia, no tienen relación entre si, pero que serán necesarios para la correcta comprensión de este trabajo de tesis. En primer lugar, se comentarán las características del ciclo de vida de los parásitos nematodos que están asociados a bovinos mediante la interacción hospedador-parasito y se incluirán efectos conocidos

de esta interacción sobre los hospedadores. En segundo lugar, se explicará el desarrollo normal de la glándula mamaria y su regulación.

1.1 Parasitosis gastrointestinales en bovinos

1.1.1 Ciclo Biológico de nematodos gastrointestinales

El ciclo de los nematodos gastrointestinales de bovinos es de tipo directo dado que no involucra hospedadores intermedios. Existen dos fases diferenciadas, una en donde el parásito se desarrolla dentro del hospedador y otra de vida libre.

El ciclo comienza cuando larvas infectivas (L3) son incorporadas con la ingestión de forraje, y luego de desprendida su cutícula externa, penetran en la mucosa del abomaso o intestino. Allí mudan a larva L4 y luego a L5, aumentando de tamaño (Levine, 1963; Amour y Osbourn, 1982). Alcanzan luego la madurez sexual y se produce la cópula entre machos y hembras, las cuales iniciarán la oviposición.

El período comprendido desde la ingestión de la larva hasta la hembra ovipositando se denomina prepatencia. La duración del mismo es variable según el género, oscilando en la mayoría entre 3 y 6 semanas (Steffan y Fiel, 1986).

El período externo, o de vida libre, del ciclo comienza cuando los huevos puestos por los parásitos son eliminados junto con la materia fecal del hospedador. Cuando las condiciones de temperatura y humedad son apropiadas los huevos eclosionan a larvas L1, que se encuentran cubiertas por una cutícula. Con posterioridad mudan a L2 cambiando la cutícula que las recubre. Durante estos dos primeros períodos las larvas se alimentan de hongos y bacterias presentes en la materia fecal y acumulan glucógeno (Williams, 1983). El desarrollo continúa hasta L3 generando una nueva envoltura por fuera y conservando la cutícula anterior. Esta característica le otorga una gran resistencia a las condiciones ambientales adversas aunque le impide alimentarse, por lo que vive de sus reservas nutritivas.

El ciclo queda completo cuando las L3 infestantes abandonan la materia fecal, favorecidas por condiciones ambientales como las lluvias, y migran a los pastos para ascender por ellos. Cuando, más tarde, éstos son consumidos por el ganado, se produce la reinfección (Steffan y Fiel, 1986).

En la mayoría de los géneros se presenta una adaptación que les permite sortear condiciones ambientales adversas mediante la interrupción temporal de su desarrollo. Este proceso se denomina inhibición o hipobiosis (Steffan y Fiel, 1986; Fiel y col., 2001) y consiste en detener su ciclo en la fase de L4 y permanecer en ella por varios meses (4-5) para luego reanudar el desarrollo, pasando a L5 y posteriormente a adulto, cuando las condiciones ambientales son favorables.

1.1.2 Ecología de la forma de vida libre

La eclosión de los huevos es favorecida por condiciones de alta humedad y temperatura media. El excesivo calor deshidrata las larvas siendo una importante causa de muerte (Steffan y Fiel, 1986), por lo que las mejores condiciones para la vida de las larvas en la región pampeana suelen darse en otoño-primavera.

Las lluvias, y en menor medida el pisoteo por parte del ganado, juegan un papel fundamental en la migración de las larvas desde la materia fecal a las pasturas (Williams, 1983).

Las mayores densidades de larvas L3 se encuentran en las proximidades de la materia fecal, dispersadas por los agentes antes citados. Como son altamente móviles, ascienden a los pastos, encontrándose la mayor proporción de ellas entre los 0 y 3 cm de altura (Williams, 1983).

1.1.3 Interacciones dentro del hospedador

El medio interno del hospedador puede ser colonizado por distintas especies de parásitos coinfectantes. El mismo se convierte en su medioambiente y es allí donde se establecen las interacciones entre especies: parásito-parásito y parásito-hospedador (Pedersen y Fenton, 2007).

Entre parásitos puede plantearse competencia intra e interespecífica por recursos o nicho. Algunos son más eficientes en la utilización de los recursos o limitan el establecimiento de otros parásitos. Por ejemplo, los nematodos del género *Ostertagia* dificultan, en ovinos, el establecimiento y la oviposición de otros nematodos como *Haemonchus*, mediante la inducción de cambios en la fisiología del tracto gastrointestinal del hospedador (Dobson y Barnes, 1995). Por otro lado, se ha observado que las infecciones de *Trichostrongylus axei* disminuyen las infecciones de *Haemonchus contortus* y *Ostertagia circumcincta* en ovejas (Reinecke y col., 1980;

Reinecke y col., 1982). Además, infecciones moderadas de *Ostertagia circumcincta* atenúan la patología normal causada por *Haemonchus contortus* en ovejas (Blanchard y col., 1986). También, suelen darse interacciones positivas o aditivas, como es el caso de las especies *T. culimbriformis* y *O. circumcincta* que pueden coexistir causando infecciones con síntomas más agudos que en las monoespecíficas (Steel y col., 1982).

Otras interacciones son las que surgen entre parásito y hospedador. Las mismas pueden ser del tipo resistencia y/o resiliencia. Resistencia es la capacidad del hospedador de controlar sus poblaciones parasitarias mediante el sistema inmune y la resiliencia es la capacidad de los animales de soportar un cierto grado de parasitismo y mantenerse productivos (Torres-Acosta y col., 2004). Estas características varían de un animal a otro dependiendo de la raza, la edad, la condición corporal y el sexo. Las razas cebuinas o aquellas razas emparentadas con cebú como los Brangus o Santa Gertrudis son más sensibles a las nematodiasis que las razas británicas tradicionales de la región pampeana (Suarez, 1994).

1.1.4 Relación inmunitaria hospedador-helminetos

El sistema inmune de los vertebrados tiene una amplísima capacidad de reacción frente a una gama importante de patógenos, pero cuando se trata de parásitos pluricelulares como los nematodos por ejemplo, la capacidad de eliminarlos completamente se ve limitada, ya que éstos interactúan con el sistema inmune de tal modo que pueden evadir, atenuar o modificar su actividad.

La respuesta inmune generada por parte de los vertebrados a causa de la presencia de helmintos es totalmente diferente a la inducida por patógenos bacterianos. Los helmintos inducen una respuesta de tipo Th2 la cual involucra diversas interleuquinas (IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13), anticuerpos como inmunoglobulina tipo G1 (IgG1), inmunoglobulina tipo E (IgE) y la expansión de poblaciones de eosinófilos, basófilos, mastocitos y activación de macrófagos (Finkelman y col., 2004; Anthony y col., 2007).

Una vez que el parásito está en el tracto gastrointestinal, produce antígenos que son endocitados por células dendríticas de la mucosa, las cuales migran a los ganglios

linfáticos regionales y presentan estos antígenos a los linfocitos T CD4+ y CD8+ (Fainboin y Geffner, 2011).

En el caso de la inmunidad tipo Th2 las células CD4+ juegan un papel fundamental (Mohrs y col., 2001), expresando diversas citoquinas y quemoquinas, entre ellas IL-3 e IL-9. Éstas activarán mastocitos y basófilos (sistema inmune innato) que producirán IL-4. En el mismo sentido, también las células CD4+ producirán IL-4 e IL-13 (sistema adaptativo). De este modo las mencionadas IL son sintetizadas conjuntamente por el sistema innato y el adaptativo.

Las células epiteliales del intestino, ante la presencia de parásitos, producen IL-25 e IL-33, las cuales activan a otros leucocitos llamados nuocitos, que producen IL-13 como respuesta, lo que da mayor sinergia al sistema ya descrito. Las IL-4 y 13 serán captadas por los receptores IL-4R e IL-13R presentes en músculo liso y células epiteliales del intestino (Allen y Maizels, 2011), que se activan y estimulan la hipercontractibilidad muscular y el movimiento de las microvellosidades de las células epiteliales para favorecer la expulsión de los parásitos (Cliffe y col., 2005). Las células epiteliales, además de su función de barrera física, son componentes integrados a la inmunidad innata y adaptativa (Saenz y col., 2008) y responden, además, promoviendo la diferenciación de las células glandulares, lo cual eleva la secreción de moco (Hasnain y col., 2011) y aumenta la producción de resistina similar a molécula β (RELM β) que es una proteína con efecto directo antihelmíntico (Artis y col., 2004; Herbert y col., 2009).

El perfil humoral de la respuesta Th2 se centra en la elevación de los niveles de IgG1 e IgE. Estos isotipos de inmunoglobulinas son dependientes de citoquinas, las cuales derivan del sistema inmune adaptativo e innato (IL-4) (Satoguina y col., 2005). Los anticuerpos serían particularmente importantes en la mediación de la respuesta a los estados extraintestinales de las infecciones con helmintos, generando una reducción en la eficiencia biológica (“fitnes”) de los parásitos (McCoy y col., 2008; Harris y Gause, 2011). Además existen evidencias *in vitro* de que IgE ejercería efectos citotóxicos sobre larvas de helmintos (Capron y col., 1995).

Esta respuesta de tipo Th2 presenta algunas características favorecidas por la selección natural frente a otro tipo de respuesta inmune. Ya que es de tipo no inflamatoria y al mismo tiempo reparadora del tejido dañado (Eming y col., 2007). Además tiende a encapsular los macroparásitos mediante una matriz extracelular de proteínas (Allen y Wynn, 2011).

1.1.5 Regulación por parte del parásito

Investigaciones recientes de la relación hospedador-parásito han mostrado que la presencia de parásitos redundante en algunos beneficios indirectos para el hospedador; como es el caso del desarrollo de un tipo de respuesta inmune que previene ciertas patologías inmunitarias. Si bien este hecho se está estudiando particularmente en humanos, es relevante destacarlo ya que la similitud del sistema inmune entre mamíferos es muy alta.

Sistemas experimentales han vinculado las infecciones parasitarias con la marcada expansión de poblaciones celulares de naturaleza inmunoregulatoria, como la activación alternativa de macrófagos T reguladores y B reguladores (Allen y Maizels, 2011).

Por otra parte, se ha observado que numerosas alergias y condiciones inflamatorias autoinmunes pueden ser atenuadas por diferentes infecciones producidas por helmintos (Fleming y Fabry, 2007; Fallon y Mangan, 2007). Los parásitos generan factores que inducen directamente la conversión de células T vírgenes a células T reguladoras y funcionales (Grainger y col., 2010) y de este modo la presencia del parásito regula la respuesta inmune por parte del hospedador. Para el caso de los rumiantes (ovejas) se ha descrito la respuesta tipo Th2 frente a la infección por *Haemonchus contortus* (Schallig, 2000).

El aumento excesivo de la respuesta Th2 genera disminución en la respuesta Th1 que es quien controla las infecciones bacterianas (Wilson y col., 2005).

Este fenómeno de regulación por parte del parásito está siendo en la actualidad objeto de estudio en humanos. En la mayoría de las poblaciones, los parásitos no representan un factor selectivo de los individuos y por lo tanto se ha ido perdiendo diversidad genética capaz de enfrentarlos, y de este modo se han favorecido genotipos proinflamatorios. Esta situación ha causado el aumento de trastornos de tipo alérgicos y autoinmunes (Allen y Maizels, 2011). Esta problemática no acontece en lugares con poblaciones parasitarias en equilibrio con las humanas, las cuales conservan una mayor diversidad genética y la inmunomodulación mediada por los parásitos.

1.1.6 Patología causada en el hospedador

En los bovinos, los géneros de nematodos capaces de causar trastornos a nivel del estómago son: *Ostertagia*, *Cooperia*, *Trichostrongylus* y *Haemonchus*. Por otro lado los que causan patologías intestinales son: *Cooperia*, *Oesophagostomum* y *Nematodirus* (Williams, 1983).

Ostertagia junto con *Cooperia* son los principales géneros causantes de enfermedad parasitaria, clínica y/o subclínica en la Pampa húmeda, causando pérdidas productivas importantes en animales jóvenes debido a su gran patogenicidad en el primer caso, y a su elevada prevalencia en el segundo (Fiel y col., 1990).

Las alteraciones estomacales son causadas mayormente por *Ostertagia*. Las larvas, una vez en el estómago, se introducen dentro de las glándulas gástricas (productoras de ácido clorhídrico) crecen y luego emergen, destruyéndolas. La emergencia de los géneros como *Ostertagia* que presentan hipobiosis (larvas inhibidas) puede darse de tres maneras: 1- Madurar pocas diariamente, 2- madurar por oleadas o 3- madurar simultáneamente; (Williams, 1983). El último caso mencionado es el más grave debido a que la emergencia larval destruye gran cantidad de glándulas al mismo tiempo (Amour y Osbourn , 1982), lo que conduce a la disminución de la acidez del estómago, necesaria para el funcionamiento de las enzimas digestivas.

La proenzima pepsinógeno requiere de condiciones ácidas (pH menor a 2,5) para transformarse eficientemente en pepsina y degradar las proteínas de las fibras vegetales. Al aumentar el pH, el pepsinógeno no pasa a pepsina, causando una deficiencia en la degradación proteica. Por otra parte, el aumento de pH causa otros problemas asociados, como proliferación de bacterias que causan diarrea. Los nematodos que, como adultos colonizan el intestino delgado, como *Cooperia spp.*, *Trichostrongylus spp.*, y *Nematodirus* (importante en zonas frías), y aquellos que colonizan el intestino grueso, ocasionan enteritis.

En todos los casos, los trastornos para el animal incluyen, disminución del apetito (Coop y col., 1977), reducción del tránsito digestivo, alteraciones de la digestibilidad del alimento así como también del metabolismo del calcio, fósforo y del balance electrolítico (Entrocasso y col., 1986). Como consecuencia, la falta de incorporación proteica de origen nutricional resulta en disminución del peso y del tejido muscular (Suarez y col., 1991).

1.2 Desarrollo mamario

El proceso de desarrollo de la glándula mamaria comienza en la embriogénesis como un derivado ecto-mesodérmico guiado por características genéticas y ambientales y se conoce como mamogénesis. Para todos los mamíferos euterios la mayor parte del desarrollo mamario ocurre postnatalmente y está dirigido por señales de tipo endocrinas y factores de crecimiento locales (Topper y Freeman, 1980; Hennighausen y Robinson, 1998). En el feto femenino la insulina y la hormona del crecimiento (GH) favorecen el desarrollo de las yemas o brotes mamarios. En cambio en el macho por la influencia de los andrógenos, elaborados por los testículos parcialmente activos, se inhibe el crecimiento mamario.

La glándula mamaria está formada por dos estructuras principales: el parénquima y el estroma. El parénquima es la parte secretora de la glándula y está constituido por tejido epitelial túbulo-alveolar, derivado del engrosamiento lineal del ectodermo del embrión, y consta de los llamados sistemas alveolar y tubular (ductal). El estroma está formado por otros tejidos complementarios de origen mesodérmico como los sistemas vasculares sanguíneo y linfático, el tejido adiposo, el conjuntivo y el nervioso (Hovey y col., 2002; Hovey y Trott, 2004).

Ambas estructuras se desarrollan muy temprano en el embrión. A partir del ectodermo ventral, se induce la migración de células epiteliales hacia ambos lados de la línea media, formando dos cordones mamarios en la superficie de la piel, constituidos por células epiteliales ectodérmicas, que se van estrechando hasta formar dos líneas, llamadas líneas mamarias de la leche (Hovey y col., 1999).

En el bovino, las líneas mamarias son visibles en embriones a partir de los 35 días de vida (Glauber, 2007). Al nacimiento, la glándula mamaria bovina consiste en una red rudimentaria de ductos conectados con la pequeña cavidad de la cisterna, que a su vez se comunica con el canal del pezón (Capuco y Ellis, 2005). Estas estructuras están incluidas en una matriz grasa. Los ductos son cuerdas de células epiteliales que penetran en el estroma (matriz grasa), y se desarrollan y ramifican a medida que el animal crece (Fig. 1 A). Estas cuerdas terminan en las unidades terminales de ducto (en inglés: *terminal ductal units* -TDU) que poseen aspecto arborescente en bovinos y son las estructuras desde dónde la glándula se va desarrollando y diferenciando (Capuco y Ellis, 2005) (Fig. 1 B y C). Los TDU contienen aproximadamente 4 a 8

estratos de células epiteliales. El estrato basal está poblado por células indiferenciadas presumiblemente precursores mioepiteliales (Capuco y col., 2002; Capuco y Ellis, 2005). Conforme avanza el desarrollo, en esta estructura compacta se forma un lumen central. En los bovinos, a diferencia de otras especies, este lumen se generaría sin que ocurra apoptosis, solamente por separación de las células (Capuco y col., 2002).

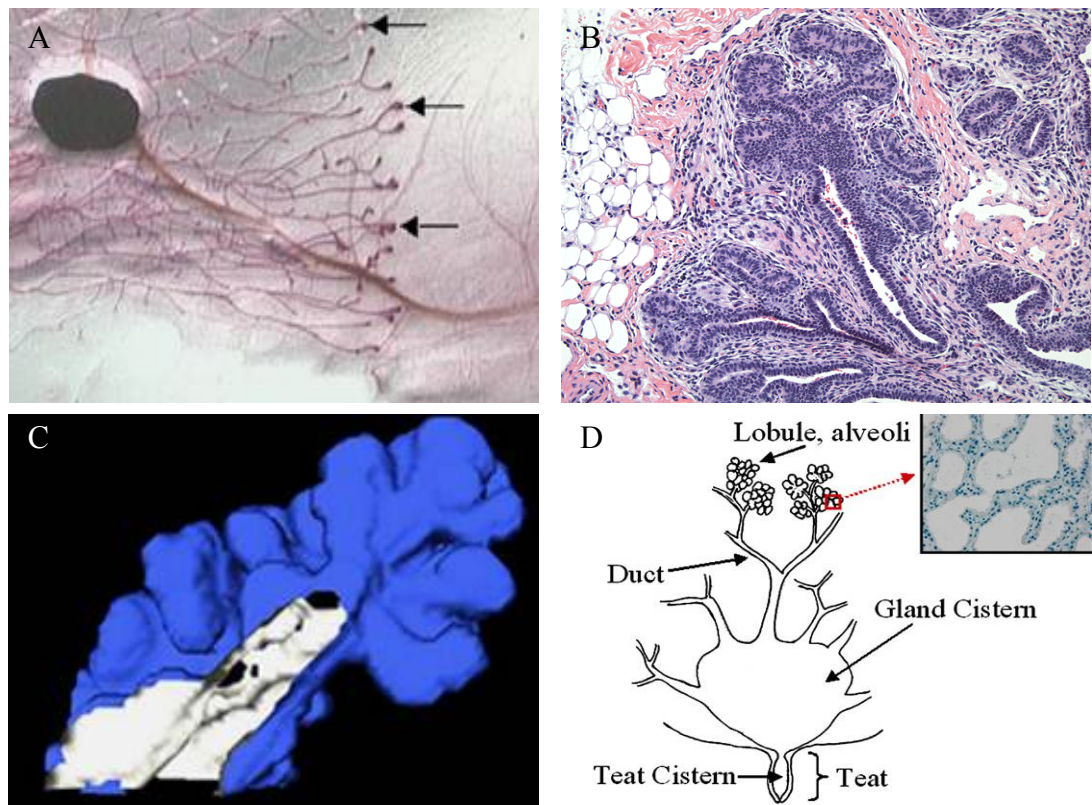


Figura 1. A: Glándula mamaria de ratón en desarrollo, las flechas señalan a los botones terminales (TEBs) (análogos a TDU en bovinos) que penetran en el tejido graso. B: Unidad terminal ductal (TDU) en bovino. C: Imagen tridimensional de la TDU bovina. D: Esquema de glándula mamaria desarrollada lobule=lóbulillo, alveoli=alvéolos, duct=conducto, gland cistern=cisterna de la glándula, teat cistern=cisterna del pezón, teat=pezón. Figuras A, B y D tomadas de (Capuco y Ellis, 2005).

Tanto en ratones como en bovinos, el desarrollo comprendido entre el nacimiento y la pubertad, está caracterizado por la acumulación de estructuras ductales epiteliales (Silberstein, 2001; Capuco y col., 2002).

El desarrollo neonatal y postnatal (hasta los 3 meses de edad) de la glándula mamaria ocurre de modo isométrico con el resto del desarrollo somático (se da al mismo ritmo que el resto del cuerpo), mientras que en el período pre y peripuberal (3-9 meses) y puberal (8-9 meses en adelante), el crecimiento se da de modo alométrico (más rápido que el resto del cuerpo) con elongación de ductos que invaden el tejido

adiposo, ramificación de las terminales (TDU) y adquisición de forma alveolar por parte de éstas (Hovey y col., 2002; Hovey y Trott, 2004).

Durante este período la síntesis de ADN en el tejido mamario se incrementa 3,5 veces (Martinet y Houdebine, 1993).

1.2.1 Regulación endocrina del desarrollo mamario

Los diferentes estadios de crecimiento, diferenciación, y también actividad secretoria e involución de la glándula mamaria, durante la vida de la hembra mamífera, están regulados fisiológicamente.

Las distintas fases de desarrollo están coordinadas por hormonas y factores de crecimiento que interactúan para llevar adelante la morfogénesis de la glándula. Las hormonas intervinientes son de origen: ovárico (estradiol y progesterona), hipofisario (GH y prolactina), tiroideo (triiodotironina (T3) y tetraiodotironina o tiroxina (T4), y factores de crecimiento de producción local y hepática (IGF-1 y factor de crecimiento epidérmico o EGF). Cada una de estas hormonas interviene en distintos aspectos de la morfogénesis glandular en una coordinada y compleja sincronización. La elongación de los ductos estaría principalmente dirigida por los estrógenos, por el sistema GH/IGF-1 y por EGF, mientras que progesterona, prolactina, T3 y T4 estimularían su ramificación (Hovey y col., 2002). Además, y en todo momento, participarían factores del estroma en una regulación paracrina, regulados a su vez por las hormonas ováricas e hipofisarias (Masso-Welch y col., 2000; Beleut y col., 2010).

1.2.2 Estrógeno y su receptor

Clásicamente se ha demostrado que el estradiol es el principal responsable del desarrollo mamario entre los estadios de prepubertad y adulta virgen (Lydon y col., 1995). En ratones, se observó, que si a los animales normales se les suministra un tratamiento anti-estrogénico durante la etapa juvenil y prepuberal se inhibe la proliferación del epitelio mamario (Silberstein y col., 1994). Por otra parte los ratones *knockout* para el receptor de estradiol tipo alfa presentan estructuras mamarias indiferenciadas durante toda la vida, lo que reafirma el papel indispensable que juega esta hormona en la mamogénesis (Bocchinfuso y Korach, 1997). En bovinos se ha

demostrado que el desarrollo mamario puberal está fuertemente vinculado con la maduración gradual de los ovarios, ya que una ovariectomía temprana anula completamente el crecimiento mamario (Purup y col., 1993; Ballagh y col., 2008). Esto fue corroborado también en cabras, en donde la ovariectomía temprana tuvo un impacto negativo sobre el desarrollo puberal de la glándula mamaria, resultando en un parénquima mamario rudimentario, en una menor expresión de los receptores de estradiol y progesterona y en una menor tasa de división celular (Dessauge y col., 2009).

Se conoce, desde hace tiempo, que los receptores de estradiol se sintetizan tempranamente en el mesénquima embrionario, (Durnberger y Kratochwil, 1980). De este último existen dos isoformas ER- α y ER- β . En el caso de glándula mamaria bovina, se ha demostrado que la isoforma alfa (ER- α) es la que predomina en el tejido durante todas las etapas del desarrollo (Schams y col., 2003; Connor y col., 2005; Meyer y col., 2007).

1.2.3 Hormona de crecimiento (GH), su receptor y hormona efectora

La hormona GH es otro participante fundamental de la regulación de la morfogénesis de la glándula mamaria. Esta hormona se sintetiza mayoritariamente en la hipófisis, en altas concentraciones durante el período de crecimiento y en menores cantidades en la adultez (Buonomo y Baile, 1990). Presenta un patrón de secreción pulsátil, sexualmente diferenciado (Chowen y col., 1996; Agrawal y Shapiro, 2001). Como su nombre lo indica, su principal función es la promoción del crecimiento corporal, y participa también en la estimulación de la mayoría de los procesos de desarrollo tisular (Renaville y col., 2002; Waters y col., 2006).

Por otro lado, el principal factor efector de la hormona GH es el IGF-1, que se secreta principalmente en el hígado, desde donde es vertido a la circulación, pero que también es sintetizado en los tejidos blancos de la hormona, estimulado o no, por ella (Yakar y col., 2005). En este sentido, se ha detectado expresión del receptor de GH (GHR) en tejido mamario bovino (Plath-Gabler y col., 2001) y en líneas celulares mamarias (Zhou y col., 2008; Johnson y col., 2010).

La hormona de crecimiento es esencial para la morfogénesis ductal, actuando principalmente a través de la estimulación de la síntesis de IGF-1 tanto a nivel hepático como mamario (Ruan y col., 1992; Kleinberg y col., 2000).

También se ha demostrado que la glándula mamaria de ratón, expresa endógenamente GH, en forma predominante en las células epiteliales, y que su nivel de expresión está regulado diferencialmente durante las etapas ontogénicas del desarrollo mamario. La acción autócrina de GH sería máxima durante el período de la pubertad (Mukhina y col., 2006).

Trabajos anteriores han demostrado un papel primario para la GH en la formación de las yemas terminales de ducto (del inglés: *terminal end buds* (TEBs)) (Ruan y col., 1992) (Ruan y col., 1992; Walden y col., 1998), estructuras altamente proliferativas que conducen el proceso de morfogénesis ductal durante la pubertad en murinos y que son homólogas a las TDU de bovinos.

1.2.4 Síntesis de IGF-1, su receptor y acción del factor

Como se ha mencionado, además de sintetizarse en el hígado, el IGF-1 se produce en diversos tejidos en donde ejerce su acción en forma paracrina. Estudios realizados en glándula mamaria murina demostraron la expresión endógena de IGF-1, de IGF-2, y de su receptor de señalización primaria, el IGF-1R, durante la fase postnatal de crecimiento epitelial rápido (Richert y Wood, 1999). Particularmente, la producción local de IGF-1 ha sido descrita en el estroma de la glándula mamaria de ratones y se postula que sería responsable de parte del desarrollo ductal, ya que la delección tisularmente dirigida del gen productor de IGF-1 en el hígado, que llevó a una reducción del 75 % del IGF-1 sérico, no alteró las concentraciones del factor en el tejido mamario, ni tampoco afectó el desarrollo mamario puberal (Richards y col., 2004). Por otra parte, en glándula mamaria de ratón, se ha encontrado que la delección total del gen que codifica para IGF-1R reduce la proliferación celular e incrementa la apoptosis en las TEBs, evidencia que sostiene la idea de que IGF-1R es fundamental para el desarrollo de las terminales ductales (Bonnette y Hadsell, 2001).

En ratones ovariectomizados y deficientes en el gen que codifica para IGF-1, no se observó desarrollo de estructuras ductales en la glándula mamaria a pesar de que las concentraciones de GH eran normales. Con el suministro exógeno de estradiol e

IGF-1, se logró el desarrollo ductal antes inexistente, demostrando la importancia de ambas hormonas. Además, la acción estimuladora del crecimiento de GH se vio significativamente aumentada cuando esta hormona se administraba conjuntamente con el estradiol durante la pubertad (Kleinberg y col., 2000).

1.2.5 Regulación de la acción de IGF-1 por las IGFBPs

Por otra parte, IGF-1 está regulado por varias proteínas de unión llamadas también IGFBPs (del inglés: *Insulin-like growth factor binding proteins*), que lo capturan con diversa afinidad. Sólo cuando IGF-1 está libre puede unirse a su receptor y desencadenar una respuesta (Frystyk y col., 1994; Cusi y Defronzo, 2000). Hasta ahora han sido identificadas seis de estas proteínas que se numeran del 1 al 6 (Rosenfeld y col., 1994; Jones y Clemmons, 1995). En el tejido mamario bovino se ha caracterizado la expresión de 3 de las IGFBPs, las -2, -3 y -5 (Akers y col., 2005).

1.2.6 Progesterona

En último lugar, no se puede dejar de mencionar a la progesterona que también participa en el desarrollo mamario, induciendo la proliferación y la diferenciación en este tejido (Lydon y col., 2000). Aunque su acción más notoria, pero no exclusiva, ocurre durante la preñez con formación ductal y alveolar, también se observó que el tratamiento con progesterona durante la etapa peripuberal incrementó la morfogénesis ductal y aumentó la ramificación de las terminales en la glándula mamaria de ratones (Hovey y col., 2002). Durante las primeras etapas del desarrollo ductal mamario también se ha detectado una fuerte influencia de la progesterona mediada por la acción de su receptor (PR) (Shi y col., 2004).

Experimentos clásicos demostraron que la progesterona y el estradiol actúan sinérgicamente promoviendo el desarrollo mamario. En conejos, la administración conjunta de estrógenos y progesterona indujo el crecimiento mamario (Yamamoto y Tuner, 1956). También en bovinos, en un experimento realizado en vacas adultas no preñadas y no lactantes, la combinación de estrógenos y progesterona estimuló la diferenciación del epitelio mamario y el desarrollo lobuloalveolar (Turner y col., 1956).

1.2.7 Vías entrecruzadas

Es importante destacar que existen interacciones entre las acciones de IGF-1/estradiol y sus respectivos receptores para regular el desarrollo mamario, particularmente es importante destacar que existen especiales interacciones entre IGF-1 y estradiol y sus respectivos receptores.

Un sinnúmero de experimentos han demostrado el efecto estimulador de estradiol sobre el sistema IGF *in vivo* e *in vitro*. En ratas prepúberes se ha observado la magnificación de la actividad mamogénica de IGF-1 cuando se trataron con 17β -estradiol (E_2) (Ruan y col., 1995). Estudios realizados en ratones demostraron que los niveles intrauterinos de IGF-1 se incrementaron luego de la exposición a E_2 (Murphy y col., 1990; Kapur y col., 1992). Se ha demostrado, en útero de ratón, que E_2 actuando a través de ER- α , estimula la señalización de IGF-1/IGF-1R e incrementa la mitosis celular (Klotz y col., 2000; Klotz y col., 2002). Efectos similares a este han sido reportados en la matriz grasa de la glándula mamaria bovina (Meyer y col., 2006; Li y col., 2006).

Por otra parte, también se da el efecto inverso del IGF-1 sobre los receptores de estradiol. Estudios realizados *in vitro* han demostrado que en ausencia de E_2 , IGF-1 puede estimular la fosforilación de ER (Aronica y Katzenellenbogen, 1993) e inducir la expresión de los genes de respuesta a estrógeno (ERGs) (Klotz y col., 2002).

En el caso de la glándula mamaria de murinos se ha encontrado evidencia concluyente de que el proceso de morfogénesis ductal está controlado por la suma de las acciones de ambas hormonas: E_2 e IGF-1 (Ruan y Kleinberg, 1999; Kleinberg y col., 2000; Ruan y col., 2005).

En la glándula mamaria bovina el estrógeno estimula mayormente la expresión de genes de IGF-1, más extensamente en la matriz grasa que en el parénquima (Berry y col., 2001; Meyer y col., 2006), y el mayor grado de proliferación celular epitelial ocurre en las regiones del parénquima adyacentes a la matriz grasa (Capuco y col., 2002).

Además, dada la similitud estructural entre el receptor de IGF-1 y el de insulina (IR) (tetrámeros de glicoproteínas compuestos por dos subunidades extracelulares α y dos transmembranales β) (Ullrich y col., 1985; Ullrich y col., 1986), es que se producen reacciones cruzadas y tanto IGF-1 como insulina pueden unirse al otro receptor, aunque con una afinidad mucho más débil que con el propio ligando

(Ozkan, 2011). En lo que concierne a la mitogénesis, ambas hormonas actúan en el proceso, pero dependiendo del contexto fisiológico específico (donde hay muchas variables interactuantes) IGF-1 puede actuar con efecto metabólico o mitogénico (Bartella y col., 2012).

Teniendo en cuenta la multitud de factores que interactúan en el desarrollo de las terneras, se ha postulado que la alteración de los mismos acarrearía consecuencias sobre el crecimiento óptimo de los animales y el desarrollo normal de sus tejidos y órganos, y esto, en última instancia, afectaría el posterior período de lactación (Lammers y col., 1999; Sejrsen y col., 2000).

1.3 Sistema en estudio.

El sistema de tambo de la Escuela Agropecuaria M. C. y M. L. Inchausti (UNLP) fue el lugar definido para el desarrollo del plan experimental del presente trabajo.

La escuela se encuentra situada en el partido de 25 de Mayo, Provincia de Buenos Aires, Argentina (35 ° 50' 56'' S; 60° 32' 24'' O) (Fig. 2 A).

El tambo se divide en dos sub-sistemas, el de producción y el de reposición (Fig. 2 B). En el primer sub-sistema se encuentran las vacas en lactación y en etapas reproductivas. El segundo sub-sistema denominado “recría” cuenta con animales jóvenes, desde el nacimiento hasta que llegan a la categoría de pre-servicio. Posteriormente pasan a la categoría “en servicio” en la cual las vaquillonas son inseminadas y, si están preñadas, son trasladadas al sector de producción para sumarlas a los rodeos en lactación después del parto.

El manejo de ambos sistemas es pastoril, sobre pasturas consociadas o verdes, dependiendo de la época del año, con rotación diaria de parcelas y suplementación con grano y reservas de forraje adecuada a cada categoría.

En el presente trabajo se investigó la influencia de parásitos nematodos en la producción de leche y el desarrollo de la glándula mamaria prepuberal. Lo cual requirió inicialmente un relevamiento parasitológico de pasturas y animales (hospedadores) para conocer los valores de infección parasitaria y posteriormente relacionarlos con parámetros fisiológicos y productivos de los bovinos.



Figura 2. A) La referencia amarilla marca la posición de la escuela M. C. y M. L. Inchausti. Ubicada entre los partidos de 25 de Mayo y 9 de Julio de la provincia de Buenos Aires (Google earth y Inav/Geosistemas SRL, 2012a). B) Imagen de los edificios escolares y los dos subsistemas (tambo y recría) (Google earth y Inav/Geosistemas SRL, 2012b).

Capítulo 2: Objetivos

2.1 General

Evaluar la influencia de los parásitos nematodos gastrointestinales en la producción lechera de vacas Holstein y en el desarrollo de la glándula mamaria de terneras de la misma raza y estudiar los mecanismos fisiológicos involucrados.

2.2 Específicos

2.2.1 Sistemas tambo y recría

-Caracterizar la dinámica de parásitos nematodos del tambo en la escuela agropecuaria Inchausti.

2.2.2 Vacas en producción

-Evaluar la influencia de parásitos nematodos en la producción lechera, por comparación del volumen de leche producido por vacas con conteos positivo y negativo de huevos de nematodos por gramo de materia fecal (HPG) durante el periparto.

-Investigar la influencia de las nematodiasis sobre las concentraciones de las hormonas relacionadas con la lactogénesis, GH, prolactina, IGF-I e insulina, mediante la medición de las mismas en suero.

2.2.3 Recría

-Evaluar, en animales tratados con antiparasitarios y controles sin tratar, las posibles diferencias en las concentraciones de las hormonas involucradas en la regulación del desarrollo y el crecimiento (GH, IGF-1) y en la hormona marcadora de la pubertad (Progesterona).

-Evaluar el efecto del tratamiento con antiparasitarios en el desarrollo de la glándula mamaria de terneras Holstein criadas en un sistema pastoril, mediante la realización de biopsias sucesivas y determinación de los siguientes parámetros:

- a. Relación: área epitelial/área estromal.
- b. Proliferación celular, mediante la cuantificación de la expresión de PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) por inmunohistoquímica (IHQ).
- c. Receptores de estrógeno alfa (ER- α) mediante IHQ.
- d. IGFbps (2 y 3) por IHQ utilizando anticuerpos específicos.

**Capítulo 3: Evaluación eco-
parasitológica del sistema de tambo
en la Escuela Agropecuaria
Inchausti.**

En el presente capítulo se expondrán los resultados de las tareas de relevamiento parasitológico, realizadas en el tambo de la Escuela Inchausti, que contemplaron los dos sub-sistemas que lo integran (tambo y recría).

El tambo cuenta con 500 hectáreas praderizadas y con verdeos forrajeros según la estación del año y con reservas de forraje de silo de maíz de producción propia. Se ordeñan 180 vacas (promedio año) en una sala con fosa central, máquina ordeñadora con extractores automáticos de pezoneras y con medidores computarizados de leche en todas sus bajadas.

Los animales del tambo están divididos en cuatro grupos, y son trasladados de uno a otro según su ciclo productivo y reproductivo. Los grupos se dividen en animales de alta producción (entre 80 y 110 individuos), animales de baja producción (entre 50 y 70 individuos), vacas secas (no productoras) que suelen compartir potreros con las vaquillonas preñadas formando un solo rodeo (entre 20 y 60) y en preparto (hasta 15 animales, según las pariciones).

El establecimiento cuenta con 200 hectáreas extras, destinadas a la cría y recría, también con praderas permanentes o verdeos anuales. Los animales de la recría (entre 400 y 500 dependiendo el momento del año) están divididos en cinco grupos. La guachera, integrada por animales jóvenes criados en estaca o jaula con alimento balanceado y leche. En esta etapa permanecen durante los primeros sesenta días de vida. Conforme van creciendo se los pasa a tres grupos sucesivos de recría (recría 1, recría 2 y recría 3) alimentados con pasturas implantadas y distintas suplementaciones de concentrados balanceados y maíz. El último grupo está integrado por vaquillonas preservicio (alrededor de 300 kg). Los machos se recrían hasta alrededor de los 250 kg y luego son sacados del sistema tambo para pasar al de invernada.

3.1 Objetivo

- Caracterizar la dinámica de parásitos nematodos del tambo en la escuela agropecuaria Inchausti.

Para el cumplimiento del objetivo se procedió a la caracterización parasitológica del sistema durante un ciclo anual completo, evaluando:

- infestividad de las praderas
- diversidad de nematodos parásitos presentes en las mismas
- carga parasitaria de los animales de las distintas categorías y
- abundancia de géneros que eclosionan de huevos de nematodos cultivados.

3.2 Materiales y métodos

Entre marzo de 2007 y febrero de 2008 se realizaron muestreos quincenales de todas las pasturas donde pastaban los animales, que permitieron (por técnicas de extracción de larvas adheridas) determinar la oferta parasitaria cuali y cuantitativa a la que estaban sometidos los individuos. Por otro lado se tomó mensualmente materia fecal a todos los animales del sistema. Estas muestras permitieron cuantificar la descarga de huevos de parásitos (HPG) además de posibilitar la identificación de géneros parasitarios presentes mediante cultivo e identificación de larvas.

3.2.1 Muestreo de pasturas

La toma de muestras de pasturas se realizó en los potreros donde pastaban los animales, recorriéndolos en forma de W y colectando pasto en la proximidad de las deposiciones fecales (de unos 14 días de antigüedad aproximadamente). El pasto colectado fue lavado con $\frac{3}{4}$ partes de agua sin cloro más el agregado de 2 o 3 gotas de detergente no iónico durante 30 minutos, utilizando un lavarropas semiautomático.

El agua de lavado se pasó por un tamiz de 37μ de abertura entre hilos, donde quedaron retenidas las larvas. El producto del filtrado, tratado con la técnica de Bareman (Fiel y col., 2005), fue depositado en embudos cónicos y las larvas se colectaron por precipitación en el fondo de un tubo de ensayo luego de 24 horas (Fig. 3). El pasto fue secado y posteriormente pesado.

Pasadas las 24 horas se retiró el tubo de ensayo y se aspiró el sobrenadante (por sifonado) considerando que las larvas estaban concentradas en el fondo del mismo.



Figura 3. Embudos para colectado de larvas.

El líquido conteniendo las larvas se colocó en un portaobjetos y se agregó solución yodurada (yodo metálico al 2 % mas yoduro de potasio al 4 %). Las larvas parásitas no se tiñen con esta solución, en cambio sí lo hacen los nematodos de vida libre propios del suelo que toman un fuerte color rojizo. Los nematodos parásitos fueron así identificados según clave de Fiel (Fiel y col., 2005) y cuantificados bajo microscopio (Fig. 4 A y B). Esta técnica permite recoger un 40% de las larvas presentes en la hierba (Fiel y Steffan, 1994).

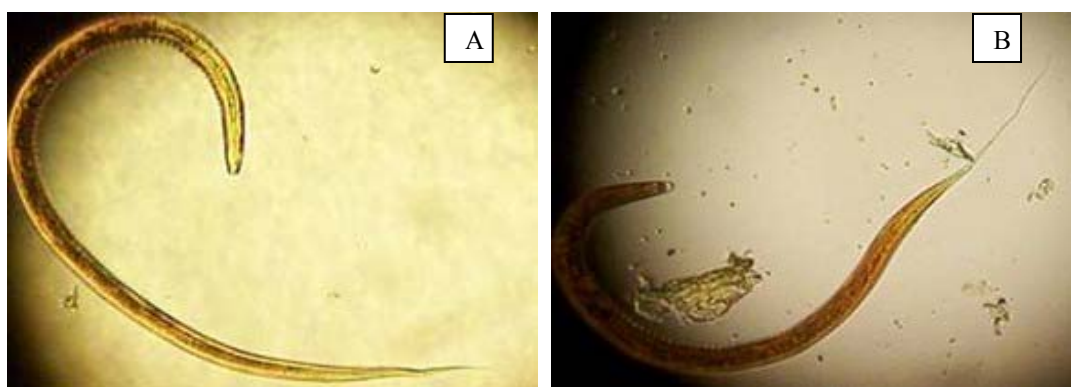


Figura 4. Larvas recuperadas de las pasturas. A) Género *Cooperia*. B) Género *Nematodirus*

3.2.2 Muestreo de materia fecal, huevos por gramo (HPG) y cultivo

Se tomaron muestras de aproximadamente 100 g de materia fecal del recto de los animales, directamente en bolsas de polietileno. De la muestra inicial se tomó una alícuota de 3 g y se diluyó (1/10) con solución sobresaturada de cloruro de sodio.

Posteriormente se contaron los huevos de nematodos (Fig. 5 A) bajo microscopio óptico en cámaras de Mac Master (Robert y O`Sullivan modificada por INTA) (Fig. 5

B), el valor cuantificado se multiplicó por el factor de dilución, expresándose el resultado en huevos por gramo de materia fecal (HPG) (Fiel y Steffan, 1994) cuando no se detectaron huevos de nematodos en la muestra de materia fecal analizada, el valor informado de HPG resulto ser cero (0).

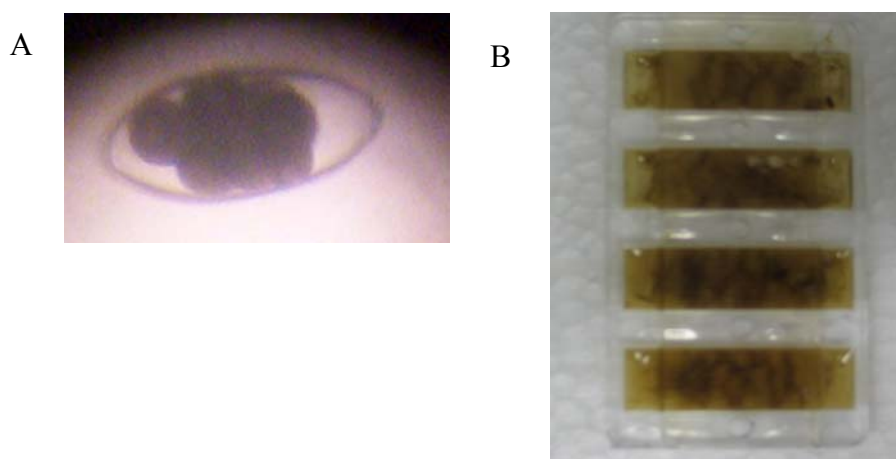


Figura 5. A) Huevo de nematodo. B) Cámara de Mac Master conteniendo dilución de materia fecal.

Para la identificación de los géneros de nematodos presentes en la materia fecal se realizó el cultivo de la misma según O'Sullivan adaptado por INTA (Fiel y Steffan, 1994) y se identificaron según clave (Fiel y col., 2005). Esta técnica se aplicó en “pooles” de muestras detectadas como positivas al HPG.

Para inducir la eclosión de los huevos se procedió según la metodología de (Henriksen y Korsholm, 1983). Brevemente, se toman 2 o 3 g de materia fecal colocándolos en un recipiente, agregando telgopor granulado y mezclando bien. Luego la preparación se envuelve en una gasa y se deja en un vaso de precipitados con agua sin cloro a una temperatura de entre 20 y 22 ° C durante 15 días. Posteriormente se recuperan las larvas del cultivo por filtrado y decantación y tras colocarse una alícuota del líquido que las contiene en el portaobjetos se las tiñe con solución de yoduro de potasio para diferenciar larvas de vida libre de especies parásitas. Las primeras se tiñen fuertemente con el colorante mientras que las especies parásitas conservan su tono original. Finalmente, se identifican y cuantifican las larvas de los géneros parásitos al microscopio.

3.2.3 Análisis estadísticos

En el caso del subsistema de recría para chequear la posible existencia de diferencia entre las cargas parasitarias presentadas por machos y hembras y la posible diferencia de carga parasitaria asociada al paso de categoría (edad), se aplicó ANOVA (análisis de la varianza) de dos vías para medidas repetidas considerando los efectos sexo y grupo (edad). Contemplando a individuos de las recrías 1 y 2, descartándose en este análisis la recría 3 de donde los machos fueron retirados en junio.

Para analizar el efecto de la edad sobre la carga parasitaria de los animales se utilizó ANOVA para medidas repetidas seguida de Duncan. Se compararon únicamente las hembras de las cuatro categorías.

3.2.4 Análisis de los subsistemas

Para facilitar la exposición de resultados, discusión y conclusiones de este capítulo, se lo separara según el subsistema del cual derivan: tambo y recría.

3.3 Resultados

3.3.1 Subsistema de tambo

Actividades realizadas: cuantificación e identificación de géneros presentes en pasturas, cuantificación de huevos en materia fecal y cuantificación e identificación de larvas producto de cultivo de materia fecal.

3.3.1.1 Larvas en la pastura.

La abundancia de larvas recuperadas del pasto a lo largo del año se muestra en la Figura 6.

El mes de abril presentó el valor promedio más elevado del año, superando en 6 veces al máximo de agosto (Fig. 6). El alto valor para este mes fue aportado principalmente por un potrero donde se introdujeron vaquillonas preñadas (provenientes del subsistema recría) el cual compartieron con vacas secas, la introducción de las mismas ocurrió a principios de marzo (2 semanas antes del inicio de los muestreos). Los rodeos de producción que en este momento no compartían pasturas con las categorías antes mencionadas, presentaron para este mismo mes un rango de 22 a 162 larvas/kg materia seca.

Entre mayo y octubre, el rango de valores medido en larvas por kg de materia seca fue de 50 a 100.

En enero la cantidad de larvas en las pasturas fue similar a las registradas en invierno.

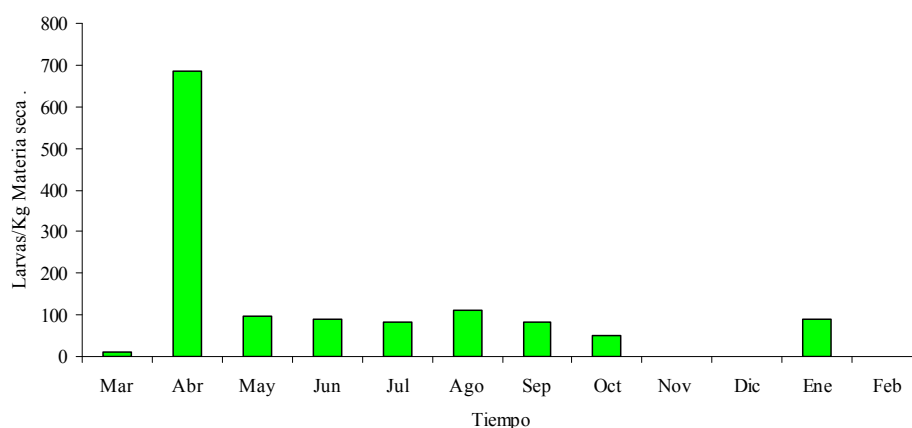


Figura 6. Densidad de larvas por kg de materia seca respecto del tiempo.

3.3.1.2 Diversidad de géneros larvales en la pastura

Los géneros larvales identificados en las pasturas fueron *Cooperia*, *Oesophagostomun*, *Trichostrongylus*, *Ostertagia*, *Haemonchus* y *Nematodirus* (Fig. 7).

Cooperia se detectó en el 66,66 % de los muestreos y representó el 35,58 % de la comunidad parasitaria, *Oesophagostomun* apareció en el 16,66 % de los muestreos y representó el 8,56 % de la comunidad, *Trichostrongylus* se detectó en el 25 % de los muestreos y representó al 2,60 % de la comunidad, *Ostertagia* se detectó en el 75% de los muestreos y representó al 44,77 % del la comunidad, *Haemonchus* apareció en el

16,66 % de los muestreos y representó al 5,70 % de la comunidad y por último *Nematodirus* que se detectó en el 16,66 % de los muestreos y contribuyó a la comunidad en un 3 % (Fig. 7).

Como se puede observar en la figura 7, *Ostertagia* es el género más abundante en las pasturas del subsistema de tambo, secundado por *Cooperia*.

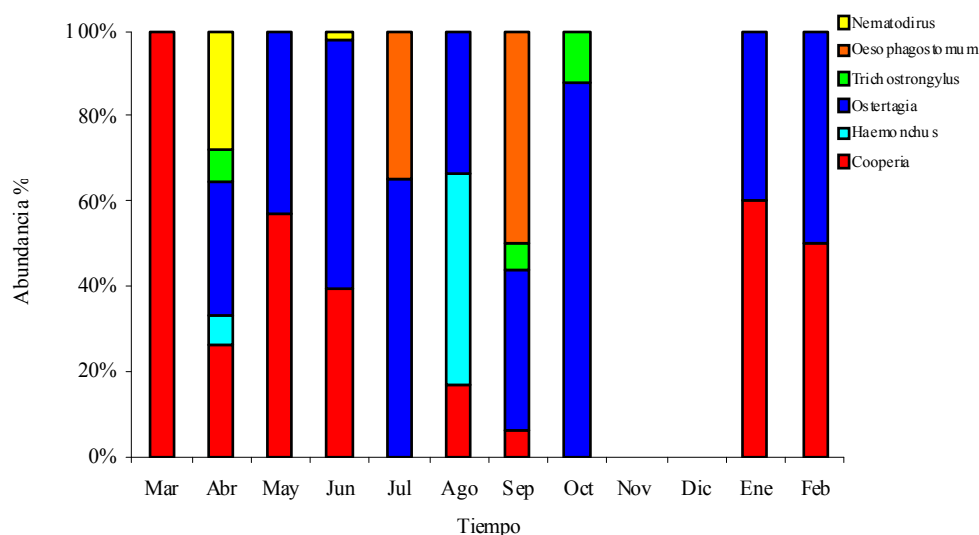


Figura 7. Abundancia relativa de géneros larvales presentes en pasturas del subsistema de tambo.

3.3.1.3 Huevos en materia fecal

Los promedios de HPG obtenidos en materia fecal para los rodeos de alta y baja producción de leche y para los rodeos de vacas secas y vaquillonas se muestran en la Figura 8.

El rango de los promedio mensuales de HPG para el rodeo 1 (de alta producción de leche) osciló entre 5,35 (marzo) y 12,32 (enero) (Fig. 8 A), en los meses de diciembre y enero el promedio tendió a elevarse a causa de un reducido número de animales que eliminaron elevadas cantidades de huevos. En el caso del rodeo 2 (de baja producción de leche) el rango fue de 0 (octubre-noviembre) a 23,14, correspondiendo este último valor al mes de mayo en el cual se detectaron algunos animales con conteos muy elevados lo cual elevó el promedio en este mes (Fig. 8 B).

El rodeo de vacas secas y vaquillonas mantuvo niveles de HPG levemente más altos que los animales en producción, el rango anual de HPG en esta categoría fue de 3,15-20,08 (Fig. 8 C). El aumento de HPG detectado en agosto fue producido por un número reducido de animales que eliminaron mayor cantidad de huevos.

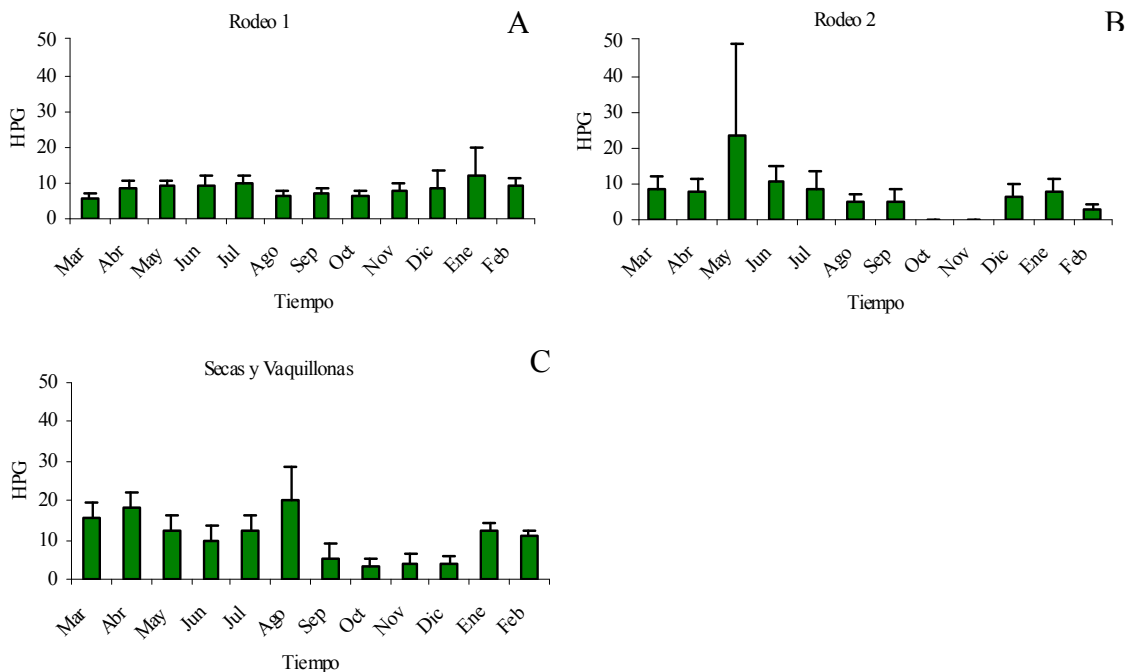


Figura 8. A) Huevos por gramo (HPG) en materia fecal del rodeo 1 (alta producción de leche). B) HPG en materia fecal del rodeo 2 (baja producción de leche). C) HPG en materia fecal de secas y vaquillonas.

En líneas generales puede observarse que los valores de HPG tienden a ser mínimos durante la primavera (octubre) y máximos durante el verano y el otoño (enero-mayo).

En todos los casos, la mayoría de las vacas presentaron un conteo de HPG=0, y solamente una baja proporción de las mismas presentaron conteo positivo. El porcentaje de positividad a lo largo del año para cada rodeo se muestra en la Figura 9. En la mayoría de los muestreos (exceptuando el mes de marzo) el rodeo de alta producción de leche (rodeo 1) resultó tener el mayor número de vacas HPG positivo.

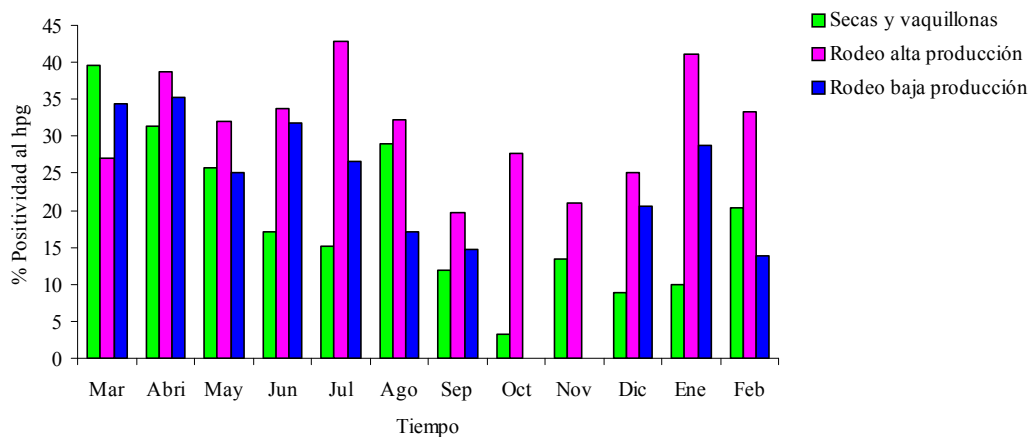


Figura 9. Positividad al HPG. Representa el porcentaje de animales que presentaron HPG>0 en cada uno de los rodeos.

3.3.1.4 Larvas producto de cultivo de huevos de nematodos en materia fecal

Los géneros nematodos representados en los cultivos fueron *Cooperia*, *Ostertagia*, y *Haemonchus* (Fig. 10). *Cooperia* se encontró en el 75 % de los muestreos realizados y representó el 8,20 % de las larvas totales, *Haemonchus* apareció en el 91,6 % de los muestreos y representó el 17,17 % de las larvas totales mientras que *Ostertagia* se mostró dominante apareciendo en el 100 % de los muestreos y representando al 74,17 % de las larvas totales.

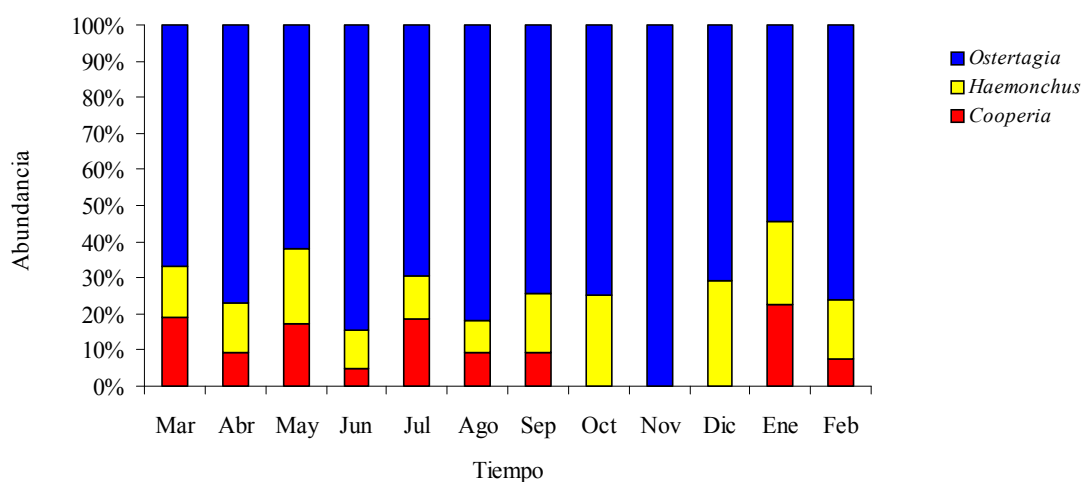


Figura 10. Diversidad de géneros de nematodos presentes en cultivo de materia fecal.

3.3.2 Subsistema de recría

3.3.2.1 Larvas en la pastura

En las pasturas correspondientes a la recría, en otoño se detectó un aumento de la carga larval, con un máximo en abril de 121 larvas/kg de materia seca (Fig. 11). En los meses siguientes hasta julio se registró una tendencia hacia cargas larvales mas bajas. Entre agosto y septiembre la comunidad de larvas se incrementó, para alcanzar un pico máximo al principio de primavera con promedios de 480 larvas/kg de materia seca. En octubre se observó una disminución de la carga larval, no recuperándose ninguna en noviembre ni diciembre.

A comienzo del verano se registraron nuevamente larvas, con tendencia a incrementar su abundancia en el período enero-febrero. (Fig. 11).

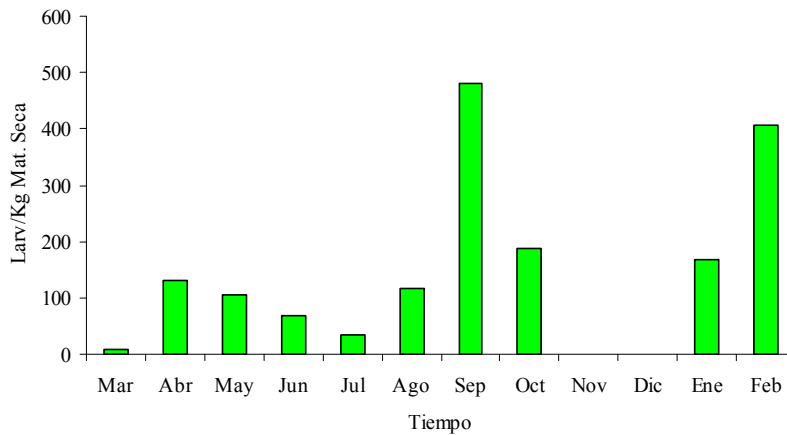


Figura 11. Densidad de larvas por Kg de materia seca respecto del tiempo (Marzo 2007 a Febrero 2008).

3.3.2.2 Diversidad

Los géneros larvales identificados en las pasturas del subsistema de recría a lo largo de un año fueron *Cooperia*, *Haemonchus*, *Ostertagia*, *Trichostrongylus*, *Oesophagostomum* y *Nematodirus*, (Fig. 12).

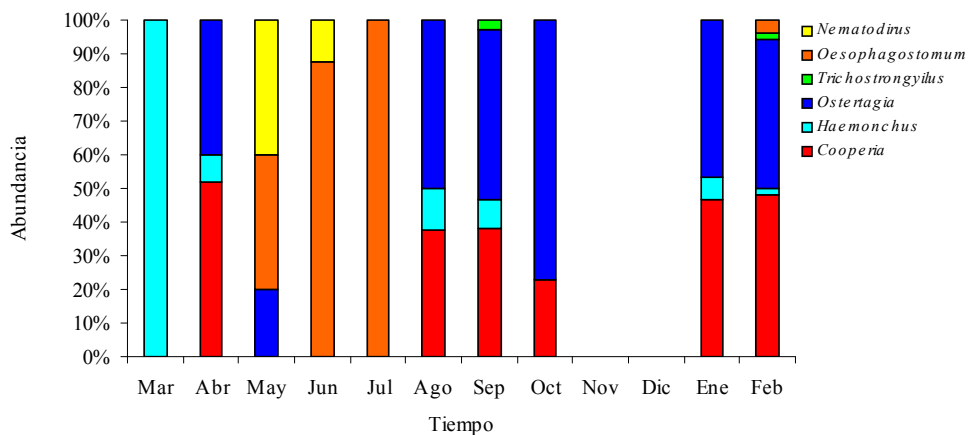


Figura 12. Abundancia relativa de géneros larvales presentes en pasturas del subsistema de recría.

Cooperia se encontró en el 53,84 % de los muestreos y representó el 26,76 % de la comunidad parasitaria, *Haemonchus* se halló en el 53,84 % de los muestreos y representó el 15,30 % de la comunidad, *Ostertagia* apareció en el 61,53 % de los

muestreos y aportó 32,83 % a la comunidad, *Trichostrongylus* se encontró en el 23,07 % de los muestreos y sumó un 1,17 % a la comunidad, *Nematodirus* se halló en el 7,69 % de los muestreos y representó el 4,39 % de la comunidad y *Oesophagostomun* se encontró en el 30 % de los muestreos y aportó el 19,51 % a la comunidad.

3.3.2.3 HUEVOS POR GRAMO EN MATERIA FECAL

En animales de la recría 1 (Fig. 13 A) (machos y hembras jóvenes, de 2 a 5 meses), el rango de los promedios mensuales de HPG en hembras fue de 67,25-500,12, mientras que para machos fue de 17,5-542,4. Por otra parte el conteo promedio en los machos superó al de las hembras en el 67 % de los muestreos, mientras que las hembras superaron a los machos en el 33 % de los mismos.

La recría 2 (Fig. 13 B) estuvo conformada por machos y hembras de mayor edad que la recría 1 (5-7 meses). En ella se observó un rango de HPG para hembras de 18,03-251,27 y para machos de 20,64-262,73. A pesar de tener rangos similares, los machos presentaron conteos promedios mayores a las hembras en el 58 % de los muestreos mientras que en el 25 % de los mismos las hembras superaron a machos. En el resto de los muestreos (17%) los promedios fueron similares en ambos sexos.

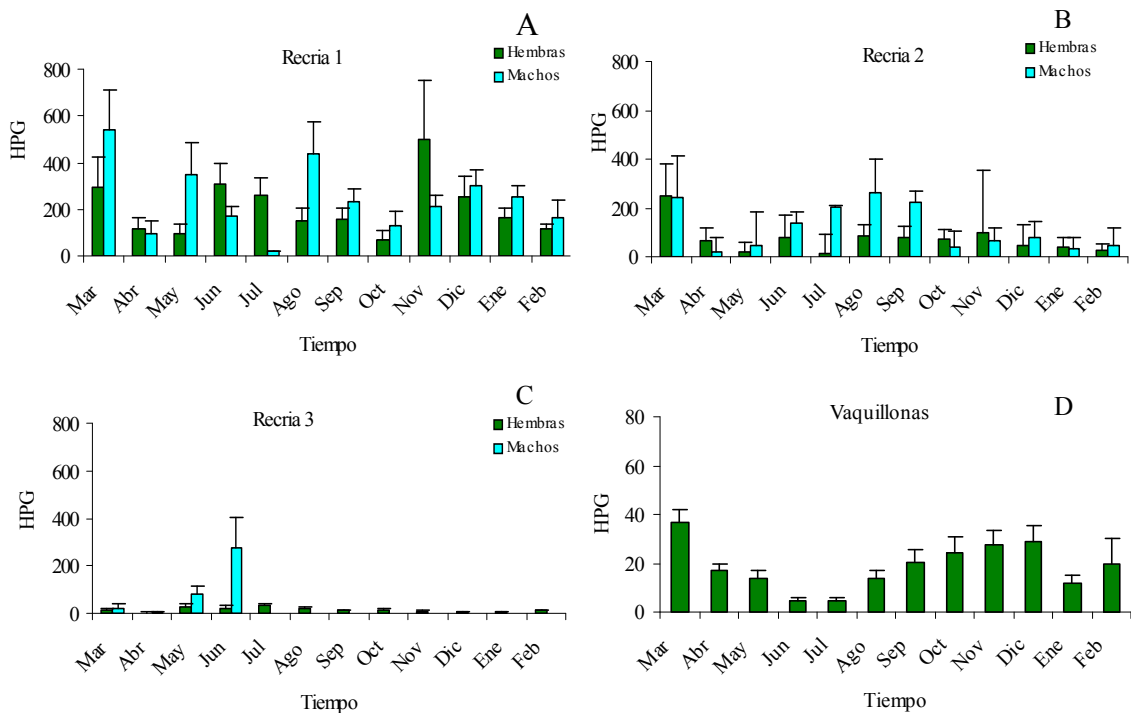


Figura 13. A, B, C) Huevos por gramo (HPG) en materia fecal de los tres grupos de recrias. D: HPG de vaquillonas (se deja constancia que en esta última hay un cambio en la escala del eje de las ordenadas de 10 veces con respecto a los anteriores).

La recría 3, con animales mayores a 7 meses, (Fig. 13 C) presentó, para hembras, un rango de 3,45-29,89 huevos por gramo, mientras que para machos el mismo fue de 20,45-273,21. Hay que destacar que estos últimos fueron retirados del sistema en el mes de junio.

Las vaquillonas en servicio conforman la categoría de animales de más edad en el subsistema de recría (Fig. 13 D). El rango de HPG de los promedios mensuales osciló entre 5,23-37,02. Se registró una variación estacional en la descarga de huevos, observándose entre marzo y julio una tendencia decreciente, mientras que entre agosto y noviembre la descarga tuvo tendencia creciente.

Estadísticamente no se detectaron diferencias en el conteo de huevos por gramo entre machos y hembras ($p=0,39$), ni se observó efecto grupo ($p=0,07$). Aunque este último valor estadístico marca una tendencia, no se registró interacción ($p=0,21$).

Sí en cambio existió diferencia entre las categorías (edad) ($p=0,004$) para las hembras, resultando la recría 1 diferente a todos los grupos, del mismo modo que la recría 2, mientras que vaquillonas y recría 3 fueron iguales entre si y distintas a los otros grupos.

3.3.2.4 Larvas producto de cultivo de huevos de nematodos en materia fecal

Los géneros detectados en cultivo fueron *Cooperia*, *Ostertagia*, *Trichostrongylus* y *Haemonchus* (Fig. 14). Durante el año *Cooperia* representó el 49,10 % de la población, *Ostertagia* el 35,30 %, *Trichostrongylus* el 8,9 % y *Haemonchus* el 6,7 %.

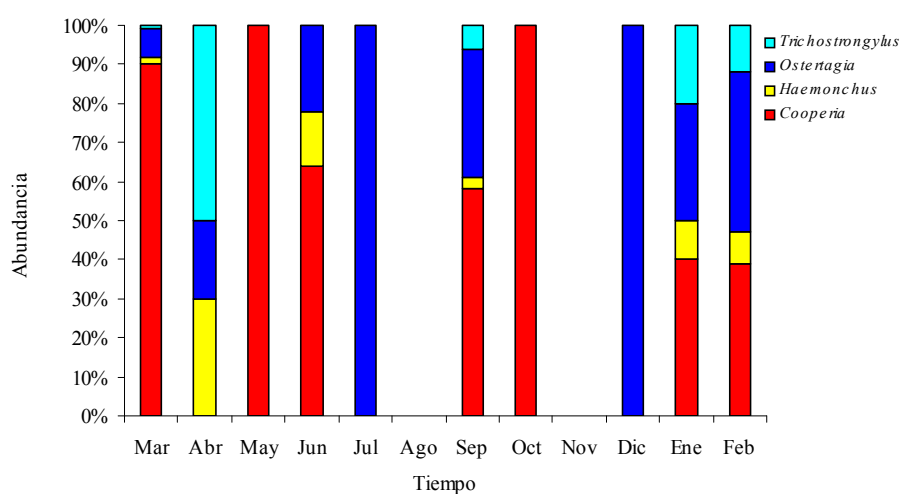


Figura 14. Diversidad de géneros larvales en cultivo de materia fecal del sistema de recría.

En los meses de agosto y noviembre no se muestran larvas dado que se perdieron los cultivos debido a un error técnico que consistió en la pérdida de humedad en los mismos que determinó su secado y posterior muerte de las larvas.

3.4 Discusión y conclusión

3.4.1.1 Subsistema de tambo

En cuanto a las larvas presentes en la pastura, inicialmente en el mes de marzo se presentaron valores esperados de contaminación aunque, por su parte en el mes de abril se registraron valores atípicamente altos. En este punto se debe considerar que, como ya se mencionó, antes del inicio de los muestreos del presente trabajo se introdujeron al subsistema de tambo las vaquillonas preñadas provenientes del subsistema de recría. Esta categoría se caracterizó por presentar mayor conteo de huevos de nematodos en materia fecal que el resto de los animales del tambo. Dado que las vaquillonas constituyen el grupo de animales más jóvenes del tambo, por su condición inmunológica un número bajo de animales tienden a presentar altos niveles de HPG, comparados con los rodeos en producción donde las cargas de HPG son más equitativas. Probablemente la descarga de huevos se tradujo en un aumento de la carga larval en el potrero donde pasaban más tiempo las vaquillonas. Esta característica generó que el promedio de larvas encontradas en el pasto aumentara (abril). En el mes de marzo se observó una baja carga larval probablemente porque las larvas en las heces estaban en desarrollo, y aún no habían migrado al pasto.

Para el período comprendido entre mayo y octubre los datos son semejantes a los citados para la región (Suarez, 1990a; Suarez, 1994), detectándose relativamente alta abundancia de larvas entre fines de otoño y principios de primavera. Entre noviembre y diciembre no se obtuvieron larvas de la hierba colectada, probablemente debido a las intensas lluvias ocurridas durante la primavera del año 2007 (Servicio Meteorológico Nacional (SMN), 2007b). Como ya se mencionó en la descripción del ciclo de vida, el agua es el principal agente dispersante de las larvas. En períodos de lluvias copiosas y sostenidas, los pastos son lavados y las larvas arrastradas de modo que la mayoría de las larvas L3 se encuentran en el suelo y no en las pasturas (las lluvias ocurrieron antes y durante los muestreos). Por otra parte, la cantidad de larvas

colectadas en las pasturas durante el mes de enero fue inusualmente alta respecto a la esperada para ese momento del año según la bibliografía (Suarez y Lorenzo, 2000). El calor y la radiación solar son agentes adversos para la supervivencia larval por la desecación que ocasionan. Este fenómeno de abundancia en una época inusual podría deberse al hecho, ya mencionado, de que la primavera de 2007 fuera atípicamente lluviosa. La producción de forraje fue abundante y el suelo se mantuvo húmedo durante varios meses. Esa humedad retenida en el suelo podría haber sido un factor clave para permitir la supervivencia de las larvas en esta época.

En cuanto a los géneros presentes en la pastura, *Cooperia* y *Ostertagia* resultaron ser los más abundantes, en concordancia con los antecedentes para la región (Entrocasso y Fiel, 1986; Suarez y Lorenzo, 2000) *Cooperia* fue muy abundante en verano y otoño, comportamiento estacional coincidente con el citado en la bibliografía (Ferreira y col., 2002).

Difieren los datos encontrados para el caso de la primavera, en donde *Cooperia* se vio pobremente representada en el subsistema, probablemente por la baja eficiencia del muestreo en la recolección debido a las lluvias antes mencionadas para este período. *Ostertagia*, por su parte, mostró un pico de abundancia en octubre. El máximo de abundancia para este género discrepó levemente con la bibliografía (Ferreira y col., 2002) ya que en aquel caso el mismo ocurrió en otoño-invierno. Probablemente esta discrepancia se deba a las diferencias geográficas entre las áreas de muestreo y a condiciones climáticas propias del año.

En cuanto a la valoración de los huevos por gramo presentados por las categorías adultas, se debe considerar que el desarrollo del sistema inmune de los hospedadores adultos inhibe, al menos en forma parcial, la ovoposición de las hembras de nematodos, por lo que ya es conocido que los niveles de HPG en bovinos adultos tienden a ser bajos. Los datos aportados en este trabajo para los rodeos de animales adultos son consistentes con las cargas usualmente bajas descritas para animales adultos (Fiel y Steffan, 1994; Fiel y col., 2005). La variable de HPG sigue una distribución asimétrica y de gran dispersión, con una alta frecuencia de casos de HPG cero y algunos individuos con HPG muy elevados, lo cual genera una gran desviación estándar (Stromberg y Gasbarre, 2006).

Solamente el 25 % de los animales mostró muestras positivas al HPG y las más altas incidencias se encontraron en el rodeo de alta producción (excepto en marzo), el cual incluye todas las vacas que parieron recientemente. En el mes de marzo el rodeo

de vacas secas y vaquillonas mostró la proporción más alta de individuos con HPG positivo. En este momento del año este rodeo estuvo formado casi exclusivamente por vaquillonas que se habían inseminado en septiembre-octubre del año anterior para reposición. Y siendo los animales jóvenes más sensibles a las parásitos (lo que implica también que estos últimos pueden expresar mas libremente su potencial reproductivo), descargan más huevos de nematodos en la materia fecal respecto a las vacas más viejas (Claerebout y Vercruyse, 2000).

Las vacas del rodeo 1 (de alta producción) fueron las que mostraron mayor porcentaje de positividad. Esto probablemente se deba a que en este rodeo, están todas las vacas “frescas” (de reciente parición), cuyo sistema inmune se halla en recuperación del estrés generado durante el período de periparto (Claerebout y Vercruyse, 2000) y por lo tanto menos eficiente en su lucha contra los nematodos.

A pesar de que la mayoría de los géneros presentan la potencialidad de producir más huevos por día que *Ostertagia* (*Cooperia* unas cinco veces más, *Haemonchus* unas diez veces más) (Fiel y col., 2005) las formas adultas del resto de los géneros son más sensibles al sistema inmunitario del hospedador, mientras que contra *Ostertagia* el desarrollo de la inmunidad es más lento (Quiroz, 1990). Este hecho podría explicar la dominancia de *Ostertagia* en los cultivos de materia fecal de los rodeos del tambo.

Se puede concluir que la dinámica parasitaria del sistema de tambo se ajusta a lo esperado para la zona del país en cuanto a diversidad de géneros parasitarios presentes, abundancia y grado de infección de los animales, con dominancia de los géneros *Ostertagia* y *Cooperia*. Además, se demostró que los rodeos constituidos por animales más jóvenes o de reciente parición, presentaron mayor proporción de individuos con HPG positivo.

3.4.1.2 Subsistema de recría

En cuanto a las larvas encontradas en la pastura existieron concordancias y diferencias en la fluctuación anual respecto a la esperada para la región según estudios previos (Suarez, 1990b; Suarez, 1994). Coincidiendo con la literatura, se registró un aumento en el número de larvas, durante el invierno y principios de primavera, favorecida por el frío y la humedad que proporcionan las condiciones óptimas para la supervivencia de las mismas. Además, las pasturas retardan su crecimiento con el frío (y por lo tanto hay menos pasto disponible) lo que ocasiona un

aumento indirecto de la densidad larval. En discrepancia con los mencionados trabajos, se observó una gran abundancia larval en periodos estivales (similares a los invernales). Esto podría deberse, en parte, a la variación geográfica entre los dos lugares evaluados. Si bien la localidad donde se realizaron relevamientos previos (Anguil, La Pampa. 36, 52° Lat. S; 64,01° Long. O) se encuentra aproximadamente en la misma latitud que el sitio de muestreo de este trabajo, ambos sitios difieren en longitud (Anguil se encuentra 350 km lineales hacia el oeste). Esta variación geográfica se acompaña por un descenso de las precipitaciones medias anuales y podría dar cuenta de las diferencias en la composición anual de las poblaciones parasitarias. Por otro lado y en forma adicional a lo anterior, otro factor que podría explicar la atípica abundancia estival de larvas es el clima, ya que 2007 se presentó como un año con copiosas lluvias particularmente en primavera que mantuvieron la humedad del suelo durante un período más prolongado. Durante fines de 2007 (diciembre) y hasta mediados de enero de 2008 las lluvias fueron escasas (Servicio Meteorológico Nacional (SMN), 2007a; Servicio Meteorológico Nacional (SMN), 2008a) pero a partir de la mitad de enero volvió a llover y se recuperó sostenidamente la humedad del suelo por lo que febrero de 2008 presentó muy buena humedad (Servicio Meteorológico Nacional (SMN), 2008b) Las temperaturas en todo el período descripto fueron las usuales para cada época del año.

La patogenicidad de los géneros parasitarios difiere entre si, siendo los de mayor importancia por su impacto en la producción: *Cooperia*, *Ostertagia*, *Haemonchus* y *Trichostrongilus* (Suarez, 1994), todos ellos fueron identificados en el sub-sistema de recría. *Cooperia* y *Ostertagia* se encontraron en la mayor parte de los meses del año, situación de prevalencia coincidente con la citada para la zona (Fiel y Steffan, 1994). Por otra parte, aunque se había descripto una mayor incidencia de *Haemonchus* y *Oesophagostomun* en verano (Fiel y Steffan, 1994), los datos recolectados en este trabajo indicaron que *Haemonchus* se presentó poco abundante a lo largo del año pero cuantitativamente constante (exceptuando el pico de marzo) y *Oesophagostomun* solo se presentó en otoño-invierno.

Trichostrongylus y *Nematodirus* resultaron dos géneros escasamente representados en estas pasturas.

Los animales mas jóvenes, integrantes de la “guachera”, criados en jaulas con balanceado y leche, no registraron huevos de nematodos en sus heces. Esto concuerda con resultados previos del laboratorio de regulación hipofisaria (IBYME-CONICET)

en los cuales efectivamente el HPG fuera 0 en terneros de esta edad (Mejía y col., 1999). Sin embargo, en aquel caso se había encontrado un retraso en el desarrollo de los terneros sin tratamiento antiparasitario, que fue explicado cuando se sacrificaron individuos y se recuperaron nematodos adultos de sus intestinos. Esto mostró que ya en la guachera, con escaso volumen de pasto ingerido, comienza la contaminación y el efecto parasitario, aunque la ovoposición se manifieste recién en la etapa de recría.

En individuos jóvenes (recría 1) fue frecuente encontrar conteos elevados de HPG (por encima de 600). Esto obedece a que los animales más jóvenes son inmunológicamente más inmaduros por lo que los parásitos pueden expresar todo su potencial reproductivo en ellos. Tal es así, que un pequeño número de adultos pueden producir cantidades importantes de huevos. Se ha demostrado que los huevos por gramo de materia fecal se pueden correlacionar aceptablemente con la población de nematodos adultos (considerando la ovoposición de cada género e identificando larvas por cultivo) hasta pasado el año de vida, luego la extrapolación pierde peso por el fortalecimiento del sistema inmunitario (Fiel y col., 2005).

En las vaquillonas preservicio, que por ser los animales más maduros del subsistema de recría ya han estado expuestos a repetidas infecciones parasitarias y por lo tanto han adquirido el mayor grado de inmunidad, las cargas de huevos en materia fecal fueron aproximadamente 22 % menores que en la categoría previa (recría 3).

Del análisis de HPG se desprende la idea de que la descarga de huevos de nematodos en las heces disminuye conforme el hospedador crece y se desarrolla. Esta evidencia se halló en hembras no así en machos, probablemente el número de categorías analizadas de estos últimos haya sido insuficiente para revelar diferencia de HPG asociada a la edad. Los resultados de esta etapa del trabajo son coincidentes con estudios anteriores que indicaron un aumento sostenido de los niveles de HPG hasta los 8 meses de edad y después un paulatino descenso hasta la pubertad (Mejía y col., 1999).

Las hembras de nematodos adultos presentan diferente fecundidad, siendo *Haemonchus* y *Oesophagostomum* las más fecundas (5.000 a 10000 huevos por día), seguidas por *Cooperia* (500-100 huevos por día) y *Ostertagia* (100-200 huevos por día) (Fiel y col., 2005).

En cultivo se hallaron 4 de los 6 géneros encontrados en las pasturas, aunque en diferente orden de abundancia, a saber *Cooperia*, *Ostertagia*, *Haemonchus* y *Trichostrongylus*. Esta diferencia en orden de abundancia de géneros larvales

ofertados en las pasturas y la abundancia de géneros larvales en cultivo (de materia fecal) podría deberse a una viabilidad diferencial de los huevos de los distintos géneros o fertilidad diferencial asociada a las condiciones de cultivo en laboratorio (diferentes a las de campo).

Si se consideran los parámetros de fecundidad y de eclosión de larvas en cultivo se puede concluir que *Cooperia* y *Ostertagia* son los nematodos que menos huevos producen pero mantuvieron niveles de eclosión altos (en condiciones de laboratorio).

A partir de los datos expuestos se puede aproximar indirectamente la proporción de poblaciones parasitarias que colonizan a las recrias concluyendo que los géneros *Cooperia*, *Ostertagia*, *Haemonchus* y *Trichostrongylus* representan la mayor parte de la comunidad de adultos parásitos.

**Capítulo 4: Influencia de los
parásitos nematodos en la
producción de leche y hormonas
relacionadas con la lactancia.**

La mayor cantidad de estudios con respecto a la influencia de los parásitos nematodos en la producción se han realizado en ganado de carne, en el cual la productividad está en directa relación con la ganancia de peso corporal (Holmes, 1985; Entrocasso, 1988; Mertz y col., 2005). En ganado lechero, trabajos sobre el impacto de la presencia de nematodos durante el desarrollo han demostrado un retraso en el inicio de la pubertad y en consecuencia un importante retraso en el inicio de la primera lactancia, además de la disminución del área pélvica a los 15 meses de edad y un aumento en la tasa de rechazo durante la lactancia (Mejia y col., 1999; Mejia y col., 2009).

Clásicamente, se asume que, en las vacas adultas, el establecimiento de un equilibrio hospedador-parásito minimiza la actividad patogénica de los parásitos. Sin embargo, durante la última década se han generado evidencias que dan cuenta del impacto negativo de los parásitos gastrointestinales en el desempeño productivo y reproductivo de las vacas lecheras. Estudios recientes han descrito el resultado del tratamiento antihelmíntico del rodeo en la producción de leche (Nodtvedt y col., 2002; Sithole y col., 2005; Charlier y col., 2007), así como también la relación entre la carga parasitaria y la producción de leche (Sanchez y Dohoo, 2002; Charlier y col., 2005). A pesar de todo, el efecto de los parásitos sobre los parámetros reproductivos durante la lactancia no está dilucidado ya que los resultados no son concluyentes (Charlier y col., 2005; Charlier y col., 2009).

Dado que se ha descrito la aparición de resistencia a los antiparasitarios en nematodos que afectan a bovinos (Hosking y col., 1996; Coles y col., 2006; Mejia y col., 2009), resultaría de gran importancia determinar parámetros de selectividad individual para tratamientos estratégicos que pudieran minimizar su riesgo. El tratamiento selectivo permitiría mantener en la población parasitaria un reservorio de alelos sensibles a los tratamientos (Kenyon y col., 2009). Por lo tanto, la identificación de animales sensibles a contraer parásitos sería una herramienta de gran utilidad para hacer más eficientes los tratamientos y prolongar la vida útil de las drogas antiparasitarias existentes.

Por otro lado, existe escasa información acerca de los mecanismos endocrinos involucrados en el detrimento productivo ocasionado por los nematodos parásitos. Trabajos previos han demostrado los efectos negativos de los parásitos en la concentración sérica de IGF-1, retrasando el inicio de la pubertad en terneras (Lacau-Mengido y col., 2000). Por otra parte, se ha descrito que la anorexia es uno de los

síntomas principales de las infecciones parasitarias (Fox y col., 1989; Simpson, 2000), causando alteraciones nutricionales que pueden modificar la concentración de hormonas metabólicas (Widmaier, 1992; Chagas y col., 2008). Además, como fue expuesto en la introducción, el sistema GH-IGF-1 es de gran importancia para la regulación de la proliferación y la diferenciación de las células epiteliales mamarias (Plath-Gabler y col., 2001), y GH es la principal hormona galactopoyética en los bovinos (Akers, 2000). Por su parte la hormona insulina actúa coordinadamente con GH, IGF-1, prolactina, hormonas tiroideas y leptina en la regulación de la partición de nutrientes y la producción de leche (Chilliard y col., 2005; Cavestany y col., 2009b). Todas estas hormonas son susceptibles de ser modificadas por infecciones parasitarias, pudiendo impactar en la producción de leche.

4.1 Objetivos

- Evaluar la influencia de parásitos nematodos en la producción lechera, por comparación del volumen producido por vacas con conteo positivo y negativo de de huevos por gramo (HPG) durante el parto.
- Investigar la influencia de nematodiasis en concentraciones de hormonas relacionadas con la lactogénesis, GH, prolactina, IGF-I e insulina, mediante la medición de las mismas en suero.

4.2 Materiales y métodos

Para el desarrollo del presente capítulo se seleccionaron cuatro rodeos de tambo, los cuales incluyen dos rodeos en producción, uno de alta producción (en lactancia temprana o media) con 80-110 individuos dependiendo del momento del año y otro de baja producción (en lactancia tardía) con 50-70 individuos; además un rodeo de vacas secas (15-30) y uno compuesto de vaquillonas preñadas para reposición (0-40).

Las vacas en producción se alimentaron con pasturas implantadas (ryegrass, alfalfa o trébol dependiendo de la época del año) con una carga animal promedio de de 1,5 animales/ha. Además, los animales recibieron suplementación: ración mezcla

de grano de maíz, girasol, semillas de algodón, cloruro de calcio y silaje de maíz en concordancia con los requerimientos nutricionales, producción individual de leche, estación y disponibilidad de forraje. Los rodeos de producción fueron ordeñados dos veces al día. Los datos individuales de producción se registraron y guardaron mediante el sistema Alpro-Milking. El período mínimo pos parto establecido para realizar la inseminación artificial fue de 50 días. Los datos reproductivos se registraron con el programa DairyCOMP 305 (Valley Agricultural Software). Las vacas secas y preñadas de reposición se mantuvieron en las mismas pasturas, o de calidad similar, recibiendo entre 10 y 20 kg de silaje de maíz dependiendo de la disponibilidad de pasturas. Veinte días antes de la fecha probable de parto las vacas se confinaron a un potrero y recibieron una ración mezcla de silaje de maíz (18-20 kg), grano de maíz (6 kg) y núcleo mineral para vacas preparto.

Durante dos años todas las vacas del sistema productivo fueron muestreadas una vez por mes, tomando materia fecal del recto y sangre de la vena coccígea. Las muestras fecales fueron mantenidas a 4°C antes del análisis. Las muestras de sangre fueron centrifugadas para la extracción de suero el cual fue conservado a -20°C para la determinación de las concentraciones hormonales.

Para cada vaca el día del parto se consideró como día 0. Las muestras obtenidas entre el día 0 y 29 post parto (pp) correspondieron al mes 0 de lactancia, y entre el día 30 y 59 pp al mes 1 y así sucesivamente. Para el período preparto, las muestras tomadas entre el día -30 y -1 correspondieron al mes -1.

Todas las vacas (n=191) que parieron entre marzo de 2007 y febrero de 2008 fueron monitoreadas en cuanto a descarga de huevos en materia fecal y producción de leche hasta el fin de la lactancia.

4.2.1 Conteo de huevos de nematodos e identificación de géneros.

Los conteos de huevos de nematodos y cultivo de los mismos se realizaron a partir de muestras frescas de materia fecal, según la técnica descrita en el capítulo 1.

4.2.2 Determinaciones hormonales

Las concentraciones de GH y prolactina se determinaron mediante el uso de anticuerpos procedentes del Hormone Distribution Program del National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK) (EEUU); la concentración mínima detectable fue de 0.8 ng/ml para las dos hormonas. Las concentraciones de insulina se midieron mediante el uso de anticuerpo anti insulina bovina (Sigma, St. Louis Missouri, EEUU) y estándares de insulina humana procedentes de los laboratorios Beta (Buenos Aires, Argentina). La concentración mínima detectable para esta hormona fue de 0,05 ng/ml. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo para las tres hormonas fueron menores a 8% y 11%, respectivamente. Para el RIA de IGF-1 fue necesaria una extracción previa del factor, con solución de etanol-ácido, según se describe en (Lacau-Mengido y col., 2000). Se utilizó el anticuerpo anti IGF-1 (UB-495) de NIDDK. El coeficiente de variación intraensayo fue del 8%, y la concentración mínima detectable fue de 2,5 ng/ml. Los coeficientes de variación fueron calculados mediante el uso de sueros controles (Farinati de Piccinni y col., 1980).

4.2.3 Análisis estadístico

La producción total de leche se comparó mediante ANOVA de dos vías utilizando el software SPSS (versión 15.0 para Windows, SPSS Inc. ©). Los factores considerados fueron, número de lactancia y positividad al HPG, con un nivel de significancia del 0,05. Los valores de las muestras individuales de HPG se compararon mediante test t de Student para el caso de comparación de dos grupos, o mediante ANOVA de una vía seguida del post-test de Bonferroni, para el caso de la comparación de tres o más grupos (se realizó una normalización previa por transformación matemática, $\log(\text{HPG}+1)$). El efecto de la positividad al HPG en torno a la parición sobre el período primer servicio-concepción se evaluó mediante el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier. Primer servicio o concepción, se definió como el evento, y día postparto como el factor tiempo. Los ajustes por número de partos (1 respecto + 2) se incluyeron en el análisis. El test Logrank se realizó en forma posterior. La proporción de positividad en vacas primíparas y multíparas se

comparó por el test de Chi cuadrado. Las concentraciones hormonales se compararon por ANOVA (análisis de la varianza) de dos vías para medidas repetidas, considerando los efectos de tiempo y grupo. Las muestras elegidas fueron para los meses 0, 2, 4 y 6 posteriores al parto (siendo el mes 0 el transcurrido desde el día del parto hasta el día 29 posparto) y los grupos de vacas incluidas fueron las que resultaron positivas (HPG>0) y negativas (HPG=0) al conteo de huevos de nematodos en la materia fecal, en el primer muestreo posparto.

4.3 Resultados

4.3.1 HPG en periparto y producción de leche

Para una descripción detallada de los niveles de HPG, géneros larvales presentes en pasturas y en cultivo de materia fecal ver capítulo 1.

Cuando se ordenó la variable HPG en función de los meses de lactancia (Fig. 15) se detectó un incremento en los niveles de HPG en torno al mes del parto (mes 0), con un ligero decrecimiento a partir de entonces. Si bien cuando se analizó la producción total de leche por vaca en función de los niveles medios de HPG durante la lactancia, no se halló correlación significativa (Spearman $r=-0,05$, $p=0,48$), cuando las vacas se agruparon por “positividad” en torno al parto el resultado fue significativamente distinto. El tiempo promedio de lactancia de las vacas resultó ser de $358,5 \text{ días} \pm 4,8$ (SEM) y la producción de leche promedio de los animales resultó $23,04 \text{ L} \pm 0,2$ (SEM).

Considerando el resultado expuesto en la figura 15 (mayor descarga de huevos de nematodos durante el periparto) se optó por agrupar virtualmente los individuos acorde a positividad al HPG (cero o positivo) en torno al mes de parición (mes -1, 0 o ambos) (Fig. 16). A partir de este arreglo se detectaron diferencias en la producción total de leche según la presencia o ausencia de huevos de parásitos en las heces en el mes 0 y/o en el mes -1. En todos los casos la mayor descarga de huevos se asoció con una disminución en la producción de leche.

Cuando las vacas fueron separadas por su positividad al HPG en torno al mes 1 (posterior a la parición, día 30 a 59 pp), no se observó efecto en la producción de leche. No se detectó interacción entre factores (número de lactancia y positividad al HPG) para la producción de leche en ningún caso, por lo tanto los individuos

podieron agruparse en función de HPG sin tener en cuenta las pariciones de cada uno para la presentación de los datos. La proporción de HPG positivo durante la lactancia

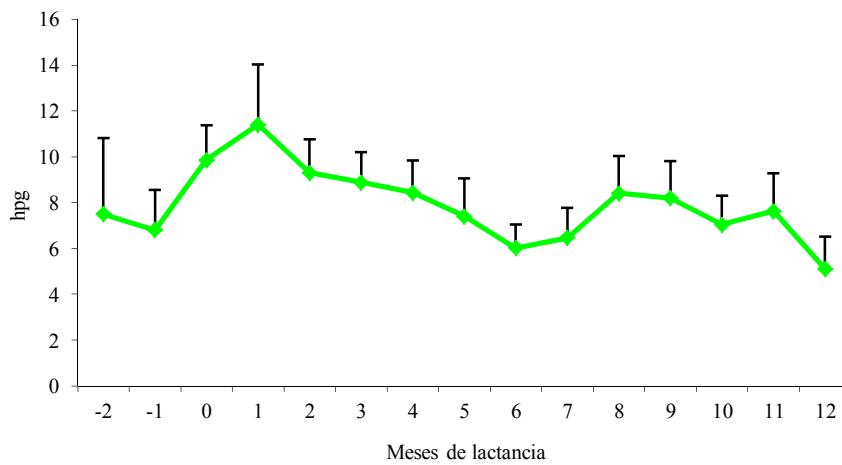


Figura 15. Niveles medios de huevos de nematodos en materia fecal de vacas (n=191) relacionados con los meses en leche. El mes de lactancia cero corresponde al muestreo realizado entre los días 0 y el 29 posparto. Las barras verticales representan el error estándar de la media (SEM). El tiempo promedio de lactancia de vacas fue de 358,5 días \pm 4,8 (SEM).

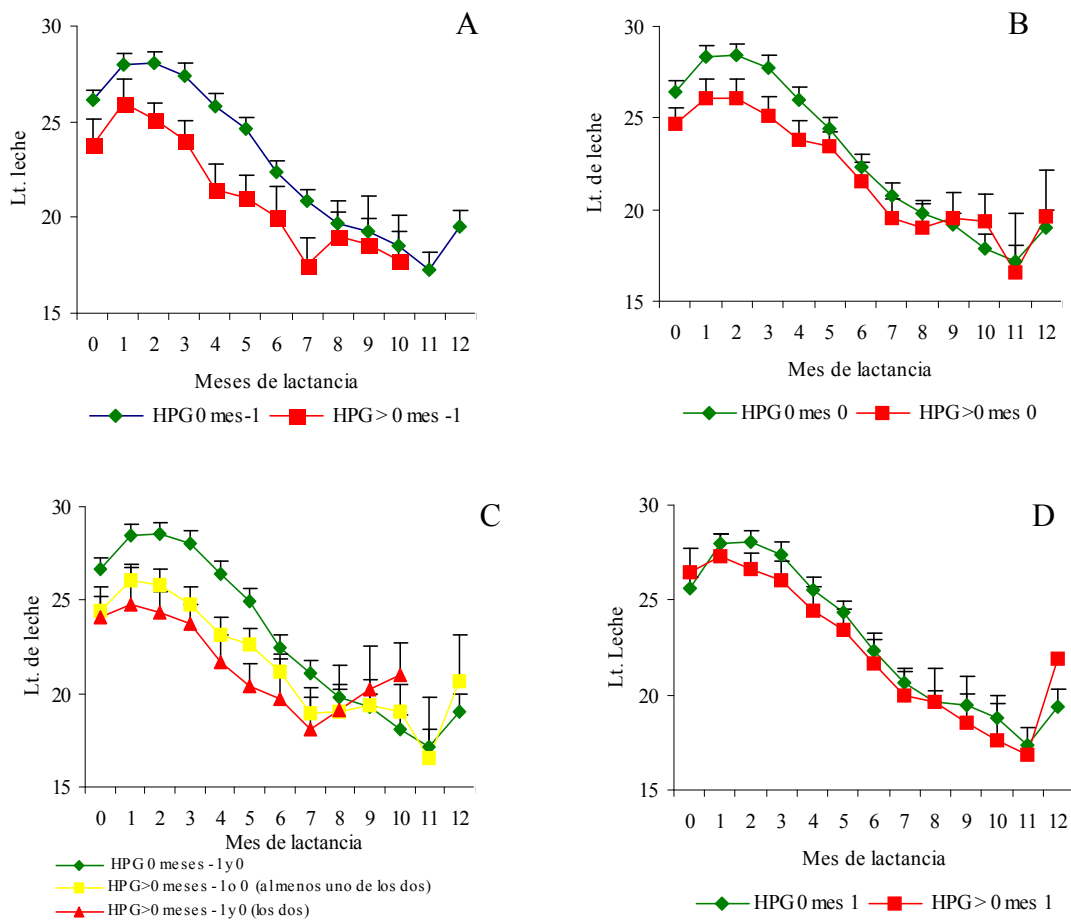


Figura 16. Producción total de leche procedente de vacas agrupadas por su positividad al HPG en torno a la parición. A) Mes=-1: muestra de materia fecal obtenida entre los días -30 a -1, B) mes=0: muestra tomada entre los días 0 a 29, C) mes=-1 y 0: se toman dos muestras, una en el mes -1 y otra durante el mes 0; D) mes=1: corresponde a muestras tomadas desde el día 30 al 59.

fue mayor en vacas primíparas (38%) que en multíparas (22%) ($p < 0,05$), sin embargo las diferencias en producción de leche dentro de cada parición se modificaron significativamente por la positividad al HPG (no hubo interacción en el ANOVA), de este modo el número de pariciones no fue considerado para análisis posteriores.

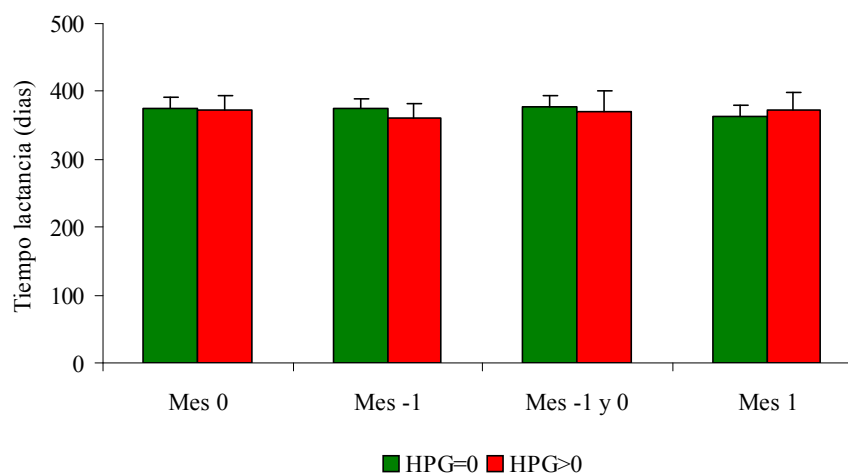


Figura 17. Tiempos de lactancia de animales negativos y positivos al HPG. Mes -1: muestra de materia fecal obtenida entre los días -30 a -1. Mes 0: muestra tomada entre los días 0 a 29. Mes -1 y 0: se toman dos muestras, una en el mes -1 y otra durante el mes 0. Mes 1: corresponde a muestras tomadas desde el día 30 al 59.

Por otra parte cuando se analizaron los períodos de lactancia de cada uno de los grupos (HPG=0 y HPG>0), no se hallaron diferencias en la duración de la misma (Fig. 17).

Se evaluaron también los niveles medios de HPG que presentaron las vacas durante los meses de lactancia (mes 1-12) y se relacionó la descarga de huevos presentada por las vacas en ese período con la condición parasitaria inicial, es decir se analizó si la condición parasitaria inicial resultaba un buen índice de predicción de la descarga de huevos de nematodos que las vacas presentarían durante el período de lactancia (tabla 1). Como se muestra, la positividad a HPG en el mes 0, o meses 0 y -1, o mes 1 pero no mes -1, predicen (dada la significancia estadística) la infección parasitaria durante la lactación.

Se evaluó también los parámetros reproductivos, como son los intervalos parto-primer servicio y parto-concepción, en relación con el grado de descarga de huevos de parásitos nematodos en el periparto, comparando vacas agrupadas por valores de HPG en las heces en torno a la parición (tabla 2).

Momento de muestreo	Grupo clasificado por HPG al periparto	N	Media HPG (error estándar)	p
Mes 0	HPG=0	128	5,0 (0,7)	0,0003
	HPG>0	63	15,4 (2,6)	
Mes -1	HPG=0	135	8,9 (1,6)	0,08
	HPG>0	56	12,4 (1,6)	
Mes -1 y 0	HPG=0 (Ambos)	81	3,5 (0,4)	<0,0001
	HPG>0 (Ambos)	37	15,0 (1,5)	
Mes 1	HPG=0	129	3,8 (0,3)	<0,0001
	HPG>0	62	19,9 (3,2)	

Tabla 1: Niveles medios de hpg en materia fecal tomada durante la lactancia (meses 1-12) en vacas clasificadas acordes a su positividad al hpg en torno a la parición.

El intervalo parto primer servicio tendió a ser mas corto ($p=0,08$) para el grupo de HPG negativo con respecto al grupo HPG positivo en el período de posparto (mes 0).

No se registraron otras diferencias significativas en ninguno de los parámetros medidos. El número de partos de cada animal no afectó estos resultados.

Momento muestreo heces	Intervalo	Categoría huevos nematodos		p Análisis de supervivencia Kaplan-Mayer (post-test longrank)
		HPG=0	HPG>0	
Mes -1	P-PS	84,5 ± 5,8	91,8 ± 7,6	0,327
	P-C	111,7 ± 7,2	117,4 ± 11,0	0,834
Mes 0	P-PS	82,2 ± 3,6	100,5 ± 8,9	0,080
	P-C	121,4 ± 7,2	131,9 ± 10,5	0,762
Mes -1 y 0	P-PS	82,1 ± 6,2 ^a	102,6 ± 11,4 ^b	0,249
	P-C	103,6 ± 7,5 ^a	121,8 ± 16,0 ^b	0,769

Tabla 2. Duración (en días) del parto al primer servicio (P-PS) y parto concepción (P-C) de vacas con conteo de huevos de nematodos en heces y sin huevos en muestras tomadas en torno a la parición. ^a Ambas muestras hpg negativo. ^b Ambas muestras hpg positivo.

4.3.2 Cuantificación de hormonas relacionadas con la producción de leche

Los niveles hormonales de GH, prolactina e insulina durante la lactancia en vacas con HPG positivo y HPG cero en materia fecal durante el posparto temprano se grafican en la Figura 18. No se detectó interacción entre factores para GH ($p=0,27$), prolactina ($p=0,48$) e IGF-1 ($p=0,80$). El efecto del tiempo se evidenció para GH e IGF-1 resultando significativo para ambas hormonas ($p<0,001$). Como se puede ver en la Figura 18 A y B, mientras las concentraciones séricas de GH disminuyeron

durante la lactancia, las concentraciones de IGF-1 aumentaron. También las concentraciones séricas de prolactina se incrementaron con el tiempo ($p=0,05$).

Los niveles séricos de GH, prolactina e IGF-1 fueron mayores en vacas con HPG igual a cero en la primera muestra de materia fecal posparto, comparadas con vacas con HPG positivo ($p<0,01$, $p=0,02$ y $p=0,02$; para GH, prolactina e IGF-1 respectivamente). Los niveles de insulina fueron estables en el tiempo y no mostraron diferencias entre los grupos.

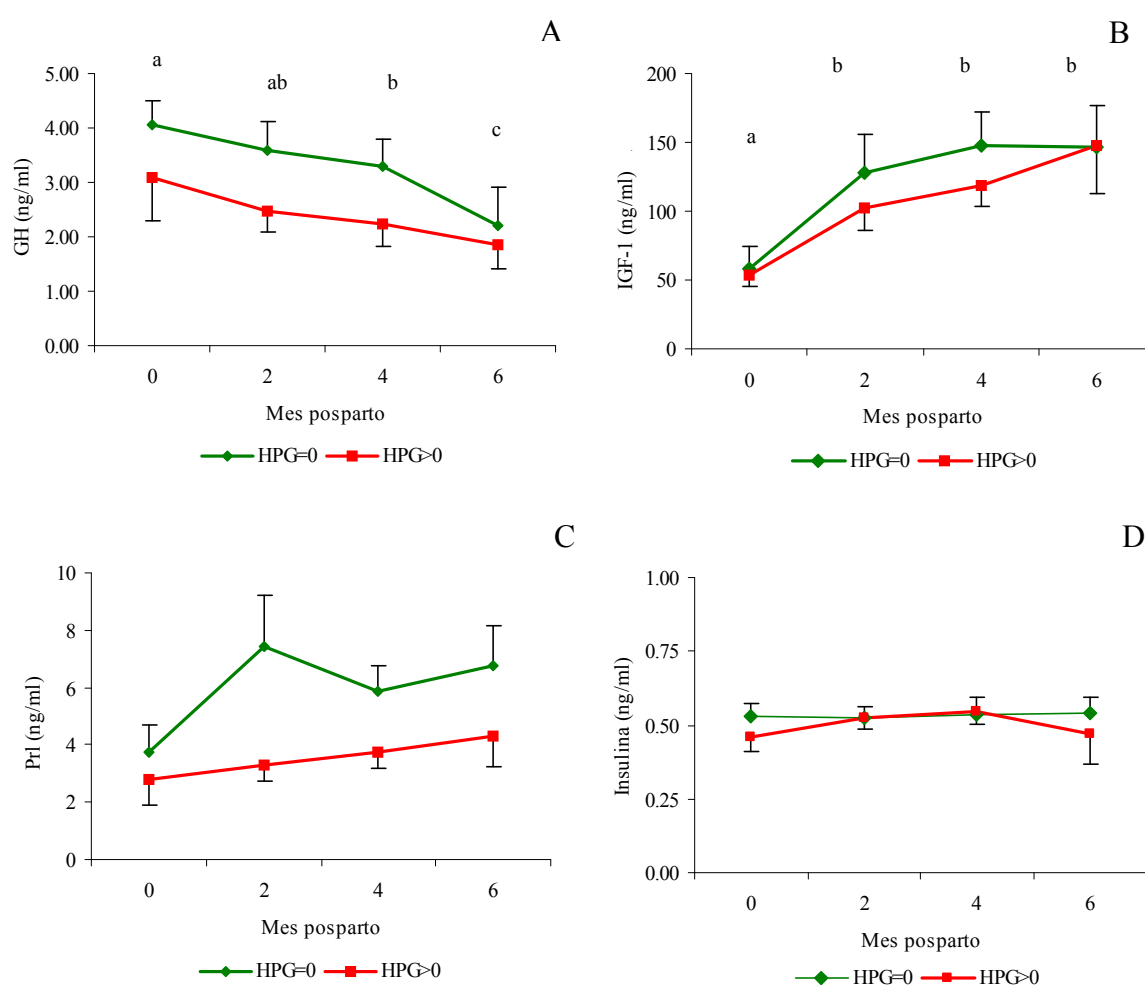


Figura 18. Niveles hormonales séricos durante la lactación en vacas con HPG>0, (línea roja) y HPG=0, (línea verde) huevos de nematodos parásitos en la materia fecal en la muestra tomada en el mes 0 (días 0 a 29 posparto). A) GH, B: IGF-1. C) prolactina (Prl). D) Insulina. Letras minúsculas diferentes indican diferentes concentraciones hormonales a los diferentes tiempos ($p < 0,05$).

4.4 Discusión y conclusión

4.4.1 Parásitos

La curva de HPG durante la lactancia demuestra que los valores medios más altos de HPG suceden en torno al parto. Esto se debió a una mayor proporción de muestras positivas en este momento (33%) más allá de los altos valores individuales de HPG. Con respecto a esto, es conocido que las vacas lecheras son susceptibles a incrementos de enfermedades durante el período de periparto. El estrés del parto y las alteraciones metabólicas durante el inicio de la lactancia deprimen la función inmunitaria, sensibilizando al individuo a ser infectado por patógenos durante este período (Barger, 1993; Sordillo y col., 2009).

4.4.2 Lactancia y HPG

Las vacas agrupadas por positividad al HPG en torno al parto, mostraron distintos niveles de HPG durante la lactancia. A pesar de que no se demostró correlación entre los niveles globales de HPG y la producción de leche (como se mencionó en el punto 4.3.1), esta última difiere si las vacas son clasificadas por su conteo de HPG (cero o positivo) en torno a la parición (pre o postparto). Cuando solamente se consideró una muestra (pre o postparto), la producción total de leche por vaca disminuyó el 12 y el 7 % (para pre y postparto, respectivamente), entre el grupo con HPG negativo y el grupo con HPG positivo. La diferencia entre los grupos trepó al 15 % cuando se consideraron dos muestreos conjuntamente (pre y postparto: muestreos en meses -1 y 0). En cambio, cuando las vacas fueron clasificadas de acuerdo a su positividad al HPG un mes después de comenzada la lactancia (mes 1), ya no se registraron diferencias en la producción de leche entre los grupos, incluso si la descarga de huevos permanecía en niveles altos por el resto de la lactancia.

La duración de la lactancia no fue afectada por la positividad al HPG sugiriendo una disminución de la producción independiente del acortamiento de la lactancia. Esto fue demostrado al analizar las curvas de lactancia, en donde se observó claramente que los meses de productividad diferente estuvieron durante el primer tercio de lactancia coincidentemente con la fase de pico de producción.

El hecho de que se observe la producción total afectada por la presencia/ausencia de huevos de nematodos en la materia fecal durante el período de periparto, hace que se pueda realizar una predicción sobre el desempeño productivo de los animales, a partir de la evaluación de la carga parasitaria de este período. La incidencia de otras enfermedades como la leucosis, metritis o la mastitis no fueron estudiadas en este trabajo, como tampoco se evaluó el conteo de células somáticas. Por lo tanto la presencia de parásitos no puede ser asignada como única causa del decrecimiento de la producción de leche. Sería esperable que futuros trabajos en este campo relacionen la carga parasitaria con otras patologías causadas por la inmunodepresión propia del periparto. Como antes se discutió, las vacas en el periparto son susceptibles al incremento de incidencia y severidad de enfermedades, probablemente debido a las adaptaciones metabólicas de la lactancia, incluyendo incremento de metabolismo de los lípidos y estrés oxidativo que deprimen la función inmune (Sordillo y col., 2009). Los resultados expuestos son consistentes con los obtenidos en Canadá con tratamientos antiparasitarios durante la lactancia, con un incremento cercano al 8% en la producción de leche que fue reportado conjuntamente con un decrecimiento sostenido del conteo de huevos (HPG) en la materia fecal (Nodtvedt y col., 2002). De manera similar un incremento de producción se reportó en Inglaterra luego de la aplicación secuencial de eprinomectina (Gibb y col., 2005). También Charlier (Charlier y col., 2005) encontró una relación inversa entre la concentración de anticuerpos anti-*Ostertagia* en tanque de reservorio de leche y la producción total de los rodeos, sugiriendo un efecto negativo de la presencia de nematodos, aunque no se estableció relación entre la infestación de las vacas individuales y la producción de leche.

En cuanto a los parámetros reproductivos, solamente pudieron ser demostrados efectos marginales, cuando una o dos muestras fueron consideradas en torno a la parición para clasificar a las vacas. El intervalo parto-primer servicio tendió a ser mayor en vacas con HPG positivo en el mes 0, comparadas con vacas HPG=0 en el mismo momento. Sin embargo este retraso en el primer servicio no fue seguido por un retraso estadísticamente significativo en el intervalo parto-concepción. Se han publicado algunos resultados controvertidos respecto a la influencia de la carga parasitaria en parámetros reproductivos. En ganado de carne, el tratamiento antihelmíntico mejoró el desempeño reproductivo (Hawkins, 1993). En Canadá un estudio clínico realizado en vacas de tambo tratadas con antihelmínticos, mostró un

decrecimiento del intervalo parto-concepción (Sanchez y col., 2002). Sin embargo, un estudio posterior del mismo grupo de investigación no confirmó estos resultados (Sithole y col., 2006), probablemente debido a una baja exposición de las vacas a pasturas infestadas. En estos estudios todos los rodeos fueron tratados, independientemente del grado de infestación de cada individuo, lo que no es aconsejable desde el punto de vista del manejo de la resistencia a las drogas antiparasitarias.

4.4.3 Hormonas

Los perfiles de insulina, prolactina, GH e IGF-1 durante la lactancia fueron similares a los encontrados en vacas lecheras de sistema pastoril en estudios previos (Becu-Villalobos y col., 2007; Mejia y col., 2009). En este trabajo se halló que la presencia de huevos de parásitos durante el periparto afecta las concentraciones séricas de GH, IGF-1 y prolactina, todas hormonas con activa participación en la regulación de la producción de leche. El incremento en los valores de GH en el grupo de HPG cero está probablemente relacionado con la mayor producción de leche observada en este grupo, ya que GH es la principal hormona galactopoyética en bovinos (Bauman, 1999). No se hallaron reportes previos respecto a la alteración de esta hormona por nematodos gastrointestinales, aunque su decrecimiento se ha descrito para varias enfermedades (Whitlock y col., 2008). Insulina no se modificó por las condiciones de carga parasitaria, sugiriendo que la síntesis de esta hormona no está relacionada con las diferencias productivas encontradas. No obstante ambas hormonas, GH e insulina, son conocidas por estar alteradas por fallas nutricionales (Hornick y col., 2000), y las interacciones entre parásitos gastrointestinales y su hospedador ocasionan un perjuicio nutricional sobre este último (Coop y Kyriazakis, 1999).

La baja concentración de GH, en este caso, es acompañada por bajos niveles de IGF-1 en vacas con HPG positivo, lo cual es esperable ya que GH incrementa la producción hepática de IGF-1. Por otro lado, IGF-1 está también relacionada con el plano de nutrición y la producción de leche en vacas lecheras alimentadas con pasturas (Pedernera y col., 2008). Las bajas concentraciones de IGF-1 en vacas con HPG positivo en el posparto temprano que se muestran en este estudio,

probablemente reflejan un peor estado energético, causado por parásitos que disminuyen el consumo de alimentos, y causan subnutrición (Simpson, 2000), o alternativamente, las vacas con un marcado balance energético negativo (reflejado en los bajos niveles de IGF-1) tienen una alta carga parasitaria ya que se ha visto que una restricción alimentaria, en presencia de oferta parasitaria, incrementa la infestación (Coop y Kyriazakis, 1999).

La asociación entre el estado nutricional y la carga parasitaria en el periparto podría ser indirectamente inferida por la relación de niveles de IGF-1 y positividad a HPG. Trabajos anteriores sostienen que los parásitos perjudican el crecimiento normal y el inicio de la pubertad (Mejia y col., 1999), y que el IGF-1 circulante está involucrado en este efecto (Lacau-Mengido y col., 2000). En este sentido, la disminución de IGF-1 durante la primera fase de lactancia puede ser también, al menos en parte, responsable por el retraso observado en el primer servicio (Cavestany y col., 2009a). La prolactina también está involucrada en la producción de leche y participa de la diferenciación de células epiteliales en la glándula mamaria (Oakes y col., 2008), y probablemente mantiene la lactancia previniendo además la muerte celular (Flint y col., 2005; Flint y col., 2006). Por otro lado, la prolactina interactúa con la leptina para aumentar la síntesis de leche (Feuermann y col., 2004). El mayor nivel de prolactina encontrado en el grupo con HPG cero podría dar cuenta, al menos en parte, de los mayores niveles productivos observados en este grupo. Sin embargo existen resultados previos en terneras prepúberes que sugieren que los niveles de prolactina son disparados, no disminuidos, por las altas cargas parasitarias (Diaz-Torga y col., 2001). Esta observación dispar podría explicarse por la diferencia de edad de los animales, ya que como se mostró, las vacas adultas presentan una carga parasitaria mucho menor que los animales en desarrollo.

Las diferencias en los niveles de prolactina en el presente grupo de vacas podrían ser el resultado de la diferencia etaria de los animales y la relativamente baja carga parasitaria registrada en vacas.

4.4.4 Conclusión

En base a los resultados presentados se concluye que el detrimento en la producción de leche de leche observado en las vacas con mayor descarga de huevos

de parásitos en el periparto, podría estar mediado por hormonas de tipo metabólicas y galactopoyéticas como GH, IGF-1 y prolactina.

4.4.5 Conclusión de tipo práctico para la producción

El conteo de huevos de nematodos en la materia fecal en torno a la parición, resultaría ser una herramienta útil para detectar vacas individuales a ser tratadas con antihelmínticos en pos de mejorar su desempeño productivo. Esta estrategia podría minimizar la utilización de drogas antiparasitarias y por lo tanto disminuir el riesgo de generar resistencia.

Capítulo 5: Evaluación del efecto
tratamiento antiparasitario sobre el
desarrollo de la glándula mamaria
de terneras Holstein

Como se ha descrito, los parásitos causan trastornos a nivel sistémico, fundamentalmente por el redireccionamiento de la energía ingerida por el hospedador, que es transferida en proporción significativa a los parásitos. En bovinos esta patología afecta principalmente a las categorías más jóvenes dado que su sistema inmunológico se encuentra en desarrollo. Entre las consecuencias que ocasionan las parasitosis se cuentan: menor crecimiento corporal, retraso puberal y alteraciones en concentraciones hormonales relacionadas con el crecimiento y desarrollo.

La hipótesis de este capítulo plantea que la influencia sistémica originada por la presencia de nematodos gastrointestinales se traduciría, a nivel mamario, en parámetros relacionados con el desarrollo de la glándula (como por ejemplo la proliferación celular y la relación parénquima/estroma), y en parámetros relacionados también con la regulación hormonal (como la densidad de los receptores de estrógeno y de proteínas ligadoras de IGF-1 que influyen sobre la actividad de este factor).

Son ampliamente conocidos desde hace tiempo los efectos de los nematodos gastrointestinales sobre la tasa de ganancia de peso corporal en rodeos de carne y de leche (Ryan y col., 1997; Mejía y col., 1999). Los mismos están relacionados además, con alteraciones morfológicas como la disminución del área pélvica, así como también con el retardo de la maduración sexual debido a la alteración del patrón de secreción de la hormona LH, y el retraso del pico de la hormona leptina previo a la pubertad (Ambrustolo y col., 1990; Zajac y col., 1991; Diaz-Torga y col., 2001). Todos ellos están interrelacionados y probablemente respondan a alteraciones fisiológicas endocrinas, producto del redireccionamiento energético, que lleva a la disminución de IGF-1 en los animales infectados (Mejía y col., 1999; Lacau-Mengido y col., 2000).

5.1 Objetivos

-Evaluar, en animales tratados con antiparasitarios y controles, posibles diferencias en las concentraciones de las hormonas involucradas en el desarrollo y el crecimiento (GH, IGF-1) y en la hormona marcadora de la pubertad (Progesterona).

-Evaluar el efecto del tratamiento con antiparasitarios en el desarrollo de la glándula mamaria de terneras Holstein mediante la realización de biopsias sucesivas y determinación de los siguientes parámetros:

- a. Relación: área epitelial/área estromal.
- b. Proliferación celular, mediante la cuantificación de la expresión de PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) por inmunohistoquímica (IHQ).
- c. Receptores de estrógeno alfa (ER- α) mediante IHQ.
- d. IGFbps (2 y 3) por IHQ utilizando anticuerpos específicos.

5.2 Materiales y métodos

En el subsistema de recría de la Escuela Agropecuaria Inchausti (UNLP) se generaron dos grupos experimentales de terneras, conteniendo 80 individuos en total, en 3 réplicas, nacidas en diferentes momentos del año (30 nacidas en otoño, 20 nacidas en invierno y 30 nacidas en primavera). Estas fueron asignadas al nacer, alternativamente, a uno de los dos grupos siguientes: controles o con tratamiento antiparasitario. El tratamiento se aplicó mensualmente de forma sistemática desde la guachera (primera etapa de la recría). Se practicó rotación de drogas, Ivermectina 1 % (1 ml/50 kg), Levamisol 15 % (1/2 ml/15 kg) y Fenbendazol 25 % (2 ml/100 kg) con el objetivo de mantener mínimos los niveles de infestación del grupo tratado. Ambos grupos fueron criados en iguales condiciones, y expuestos a la misma infestividad larvaria de las pasturas. En forma mensual, todas las terneras fueron pesadas, y se les extrajo, a cada una, materia fecal para el conteo de huevos de nematodos para evaluar el grado de contaminación individual y la eficacia del tratamiento, y muestras de sangre de la vena caudal para evaluar las concentraciones hormonales.

5.2.1 Determinaciones hormonales

La sangre extraída a los grupos experimentales fue mantenida a temperatura ambiente toda la noche y posteriormente se extrajo el suero por centrifugación, el cual se mantuvo congelado a -20 °C hasta el momento de realizar las determinaciones.

En suero se cuantificaron IGF-1 y progesterona por RIA. Para ambos casos se determinó la concentración de la hormona en ng/ml (Lacau-Mengido y col., 2000). Para el caso particular de progesterona fue significativo identificar el momento del desarrollo (edad) en que se produce el primer pico de la hormona que indica el inicio de la pubertad (Lacau-Mengido y col., 2000).

5.2.2 Evaluación del efecto del tratamiento antiparasitario en la glándula mamaria de terneras Holstein

5.2.2.1 Biopsias de glándula mamaria

Durante 3 años (2007-2009) se obtuvieron muestras de tejido mamario a través de la realización de biopsias en terneras de 20, 30, 40 y 70 semanas de edad. Se utilizó el cuarto caudal derecho de la ubre de 6-8 animales por grupo en cada repique (3-4 controles y 3-4 tratadas). Para esta práctica se siguió la metodología empleada por Sorensen (Sorensen y col., 2006), adaptada a terneras Holstein por Licoff (Licoff y col., 2009) (Fig. 19).

Los animales fueron sedados en la manga con acepromacina 1% (0,1 mg/kg) y posteriormente sujetos y volteados para ubicarlos en posición decúbito supino. En esta posición se realizó la tricotomía, limpieza y antisepsia de la zona de biopsia y se colocó anestesia local por infiltración con lidocaína 2% (5 ml). Después de aproximadamente 7 minutos se procedió al biopsiado, para lo cual se utilizó un



Figura 19. Toma de biopsia en una ternera Holstein. A) Introducción de la aguja y disparo del biopsiador. B) Estado del animal posterior a la toma de muestra. C) Muestra de tejido mamario a ser retirada de la aguja de biopsia.

biopsiador automático para tejidos blandos, marca TRU-CORE I (Angiotech). Con este equipo se utilizaron agujas para biopsias de 14 G X 20 cm (Angiotech).

5.2.2.2 Procesamiento del tejido mamario

Las muestras de tejido mamario de cada animal en cada uno de los tiempos antes mencionados, de aproximadamente 40 mg cada una, fueron fijadas en formol-buffer 4% durante 6 a 8 horas a temperatura ambiente. Luego de un lavado prolongado en agua corriente y buffer fosfato salino 0,05 M pH 7,5 (PBS) se deshidrataron en concentraciones graduales crecientes de alcohol etílico, se aclararon en xilol y se embebieron en parafina siguiendo protocolos de rutina (Woods y Ellis , 1994). Los tacos histológicos fueron cortados en un micrótopo rotativo manual. Los cortes seriados de 5 µm de espesor fueron montados en portaobjetos previamente tratados con 3-aminopropyltriethoxysilane (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y secados durante 24 hs a 37 °C.

5.2.2.3 Histología (medición de la relación parénquima/estroma)

Luego de realizados los cortes histológicos, se efectuó una tinción de rutina con hematoxilina/eosina. La hematoxilina es una base que tiñe de manera preferencial los componentes ácidos de la célula de un color azulado. El núcleo celular y los ribosomas contienen gran cantidad de componentes ácidos por lo que presentan gran afinidad por este colorante. La eosina es un ácido que tiñe los componentes básicos de la célula de color rosado (Gartner y Hiatt, 1995). De este modo, el parénquima de la glándula, que posee gran cantidad de células epiteliales con núcleos de pequeño tamaño se tiñe de azul-violeta, mientras que el estroma que posee abundantes fibras colágenas embebidas en una matriz amorfa, células de mayor tamaño y con almacenamiento lipídico se torna rosado-blancuzco (Fig. 20 A y B). Una vez realizado este procedimiento se tomaron entre 30 y 40 imágenes recorriendo todo el corte histológico a X 400.

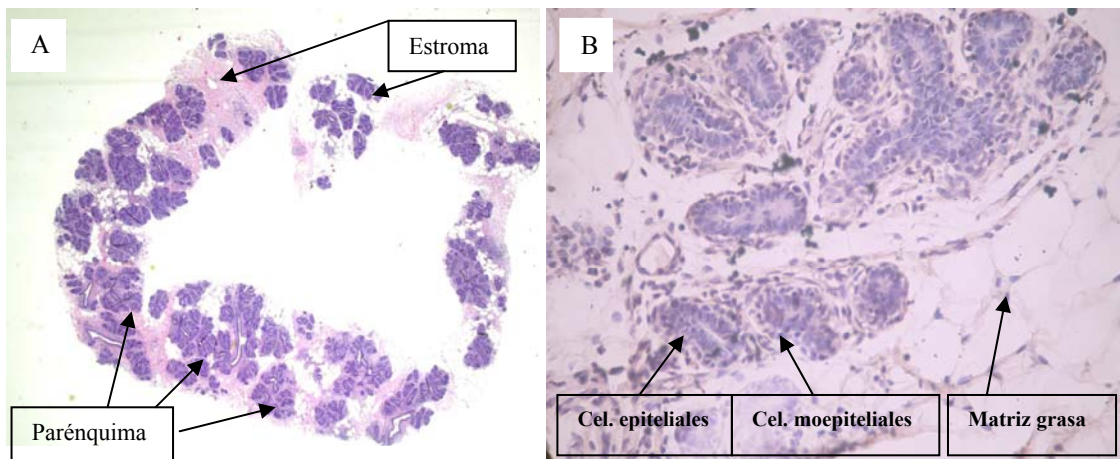


Figura 20. A) Biopsia completa de glándula mamaria bovina (X100). B) Unidad ductal terminal (TDU) (X 400). El área azul en ambas figuras representa al parénquima mamario mientras que el área rosada-blanquecina corresponde al estroma mamario. Coloración: Hematoxilina/eosina.

Utilizando el software Image-Pro Plus (Versión 3.0 de Media Cybernetics, 1993-1997), se delimitó y cuantificó el área teñida de azul integrada por células del parénquima y mioepiteliales, para luego calcular el cociente de ésta respecto al área total del corte (parénquima más estroma).

5.2.2.4 Inmunohistoquímica

Los diferentes anticuerpos utilizados y sus concentraciones de uso se detallan en la tabla 3. Cada anticuerpo fue probado al menos en 5 secciones de tejido para cada muestra. Se utilizó el método streptavidina-biotina-inmunoperoxidasa según descripciones previas de (Dallard y col., 2005; Dallard y col., 2007; Ortega y col., 2007; Dallard y col., 2011). Brevemente, las secciones fueron desparafinadas, hidratadas y tratadas con recuperación antigénica o no, dependiendo del anticuerpo primario utilizado. La actividad de la peroxidasa endógena fue inhibida con H_2O_2 1% y las uniones inespecíficas fueron bloqueadas con suero normal de cabra 10%. Las secciones fueron incubadas con el anticuerpo primario 18 hs a $4^{\circ}C$. Luego de tres lavados sucesivos con PBS de 5 minutos cada uno, los cortes fueron incubadas con el anticuerpo secundario biotinilado, seleccionado específicamente de acuerdo al tipo de anticuerpo primario utilizado (monoclonal o policlonal), durante 30 minutos a temperatura ambiente. La visualización del antígeno se realizó por el método streptavidina-peroxidasa (BioGenex, San Ramon, CA) utilizándose como cromógeno 3.3-diaminobenzidina (DAB) (Liquid DAB-Plus Substrate Kit - Zymed, San

Francisco, CA). Finalmente los cortes fueron lavados en agua destilada, contracolorados con hematoxilina de Mayer, deshidratados y montados.

<i>Anticuerpos</i>	<i>Huésped</i>	<i>Dilución</i>	<i>Procedencia</i>	<i>Recuperación antigénica (RA)</i>
<u><i>Primarios</i></u>				
PCNA (Clon PC-10)	Ratón	1:400	Novocastra	Microondas
ER- α (Clon 1D5)	Ratón	1:50	Biogenex	Olla a presión
IGFBP-2	Conejo	1:100	Biotech Reagents	Microondas
IGFBP-3	Conejo	1:100	Biotech Reagents	Microondas
<u><i>Secundarios</i></u>				
Anti conejo IgG	Cabra	1:300	LETH, UNL, Sta. Fe, Arg.	
Anti ratón IgG	Cabra	1:120	LETH, UNL, Sta. Fe, Arg.	

Tabla 3. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados, sus diluciones de trabajo, método de recuperación antigénica empleado y procedencia.

5.2.2.5 Controles

Para verificar la especificidad de la técnica utilizada se realizaron los siguientes controles:

A- Omisión del anticuerpo primario y reemplazo por suero no inmune de conejo o ratón según el anticuerpo primario que se reemplaza (Fig. 21, A).

B- Omisión del anticuerpo secundario biotinilado.

C- Para excluir la posibilidad de la no supresión de la actividad de la peroxidasa endógena, algunas secciones fueron incubadas solamente con el reactivo DAB.

D- Como control positivo se utilizaron tejidos con reactividad conocida al anticuerpo primario utilizado.

5.2.2.6 Análisis de imágenes

Se obtuvieron imágenes de todas las secciones histológicas provenientes de todos los animales de cada tratamiento (50-60 por individuo), mediante una cámara de video color CCD Moticam 2000 (Mikron Instrument Inc., California, USA) montada en un microscopio convencional Olympus CX31, (Olympus Co., Japón) usando un

objetivo 40X. Se digitalizaron campos microscópicos que cubrieron toda el área a analizar y se almacenaron bajo el formato TIFF con una definición de 1200 x 1600 pixels y 24 bits de color. Se realizó el análisis de las imágenes utilizando el programa Image-Pro Plus 3.0.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA). A la magnificación usada, cada píxel de la imagen correspondía a 0,13 μm , y cada campo representaba un área de tejido de 0,032 mm^2

5.2.2.7 Cuantificación de la inmunomarcación

Los detalles metodológicos del análisis de imágenes como un método validado para cuantificar niveles de expresión fueron previamente descritos (Dallard y col., 2005; Ortega y col., 2007; Dallard y col., 2010; Dallard y col., 2011). Brevemente, el área marcada por IHQ por la reacción del anticuerpo, fue calculada como porcentaje del área total evaluada a través de análisis de segmentación de colores, localizando todos los objetos de color específico (marcación marrón). De la marcación marrón fue seleccionado el color de mayor intensidad y luego se aplicó una máscara para separar los colores de forma permanente. El porcentaje de área inmunomarcada (máscara negra) fue calculado para al menos 50 imágenes de cada uno de los cortes que comprendían estructuras de parénquima y estroma.

La inmunomarcación para PCNA, ER- α , IGFBP-2 e IGFBP-3 se cuantificó utilizando la metodología descrita.

5.2.2.8 Evaluación y cuantificación de la proliferación celular

La proliferación celular se evaluó a través de la inmunomarcación de PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular). La marcación de PCNA fue revelada por IHQ utilizando un anticuerpo monoclonal específico (Tabla 3).

Todas las células inmunomarcadas para PCNA se consideraron positivas. Éstas presentaron reacción nuclear positiva con alta heterogeneidad en la intensidad de la tinción (débil, moderada e intensa) (Fig 21, B). Por este motivo se procedió a medir sólo el área representada por los núcleos de las células intensamente marcadas. En forma seguida se delimitó el área ocupada por las unidades ductales terminales (TDU) y se incluyó a las células mioepiteliales en la delimitación. Posteriormente se marcó la reacción nuclear más intensa y se generó automáticamente una máscara en blanco y

negro mediante el programa Image Pro-Plus 3.0.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MA) que permitió cuantificar el porcentaje de área inmunomarcada (Fig. 21, C).

5.2.2.9 Evaluación y cuantificación de proteínas ligadoras de IGF-1 (IGFBP-2 y 3)

Las proteínas ligadoras de IGF-1 se evaluaron mediante anticuerpos específicos (Tabla 3). En el tejido mamario estas proteínas están presentes en el estroma y en el parénquima, evidenciando una marcación de tipo citoplasmática en las células que componen el tejido (Fig. 21, D). En las imágenes se consideró como positiva la marca específica de mayor intensidad. Posteriormente se efectuó la máscara en blanco y negro que permitió cuantificar el porcentaje de área marcada (Fig. 21, E), refiriéndola a área total observada.

5.2.2.10 Evaluación y cuantificación de receptores de estrógeno (ER- α)

Para la visualización de los receptores de estradiol se utilizó el anticuerpo específico citado en la tabla 3. Dado que la marcación presentada por el ER- α es nuclear, se siguió la misma metodología de tratamiento de imágenes y cuantificación descrita para PCNA.

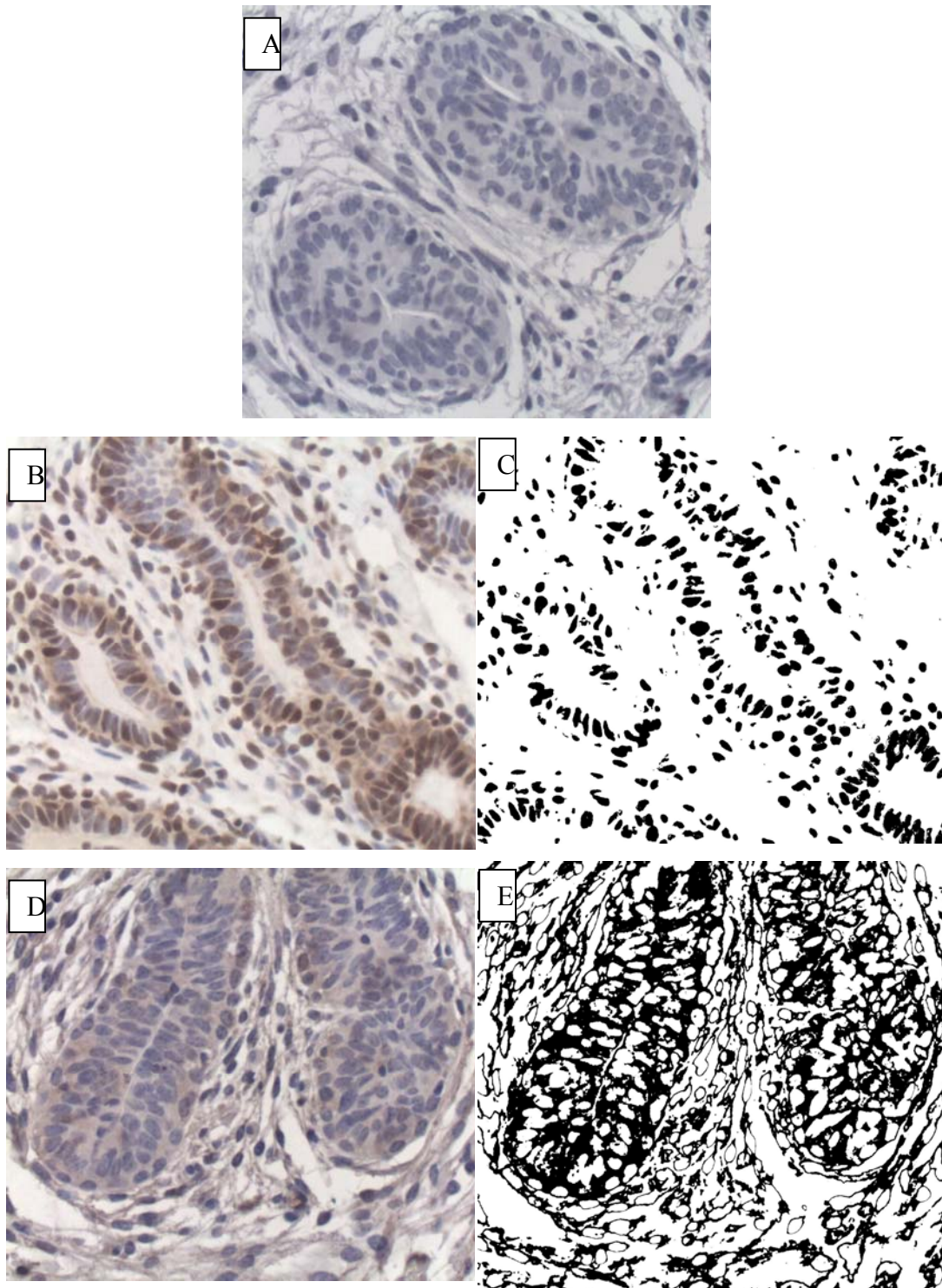


Figura 21: A) Muestra control negativo de la técnica de inmunohistoquímica, la cual carece de anticuerpo primario. B) Muestra tratada con anti-PCNA. C) Máscara de la imagen –B revela marcación nuclear. D) Muestra tratada con anti-IGFBP-2. E) Máscara de la imagen –D revela marcación citoplasmática. X 400.

5.2.3 Análisis estadísticos de los datos

Para la evaluación de datos provenientes de muestras de materia fecal, pesos y concentraciones séricas de IGF-1 de terneras tratadas y controles se utilizó ANOVA de dos vías (o factores) para medidas repetidas considerando el tiempo (edad) como un factor y el tratamiento como otro factor.

Cuando hubo diferencia significativa en tiempo, se aplicó a cada punto (edades de los animales) t Student como post test, este análisis indicó el o los tiempos donde se encontraban las diferencias entre grupos.

Los datos correspondientes a la entrada en pubertad (primer pico de progesterona) se analizaron por medio de análisis de supervivencia y a las curvas arrojadas por este se les aplicó la prueba del logaritmo del rango.

Para comparar los parámetros medidos de glándula mamaria (% de área de parénquima, PCNA, IGFBP-2 y 3 y ER- α) se utilizaron tests no paramétricos. Para determinar diferencias entre grupos experimentales a lo largo del tiempo (efecto tratamiento) se utilizó el test de Friedman. El mismo test fue utilizado para evaluar variaciones de los parámetros dentro de los grupos (efecto tiempo dentro de cada grupo). Para evaluar el efecto del tratamiento puntualmente dentro de cada uno de los tiempos (edades de los animales) se empleó la U de Mann-Whitney.

En todos los casos la significación estadística se fijó en $p < 0,05$.

5.3 Resultados

5.3.1 Influencia de los nematodos a nivel sistémico

5.3.1.1 Conteo de huevos por gramo en materia fecal

Se evaluó la cantidad de huevos de nematodos parásitos en materia fecal que presentaron los animales sometidos a ensayo (tratados con antiparasitarios y controles). Ambos grupos presentaron conteo de huevos a partir del 5^{to} mes de edad (Fig. 22).

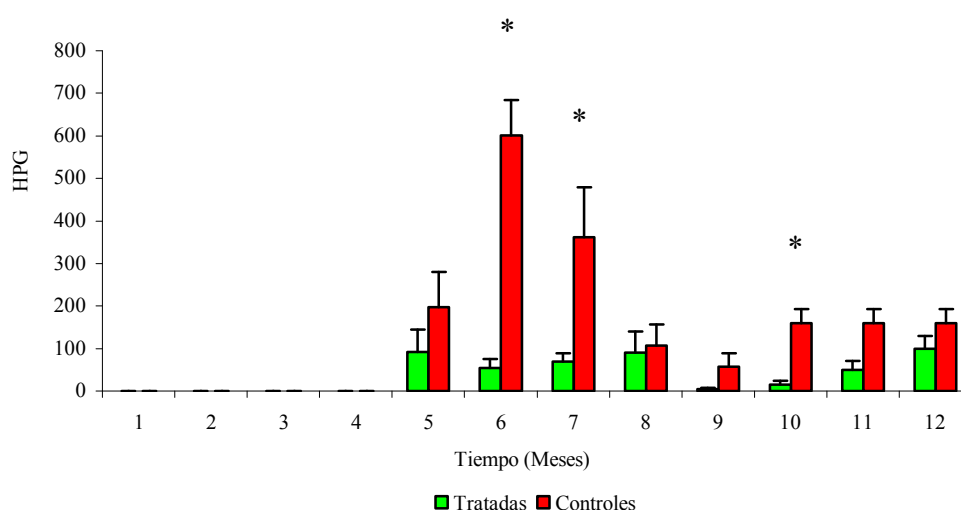


Figura 22. Evaluación de huevos por gramo (HPG) según la edad en terneras tratadas con antihelmínticos y controles. Las barras representan las medias \pm SEM. *Indica $p < 0,05$ para cada período de tiempo.

El análisis estadístico reveló interacción (tratamiento x tiempo) ($p_{T \times t} = 0,012$). Por otra parte, se observó un efecto del tiempo de muestreo para los diferentes tratamientos ($p_t = 0,04$) y la evaluación estadística en cada período de tiempo reveló un aumento ($p < 0,05$) en el conteo de HPG en los animales controles sin tratamiento antiparasitario con respecto a los tratados a los 6, 7 y 10 meses de edad (Fig. 22). El conteo de HPG en materia fecal fue mayor en el grupo de terneras controles sin tratamiento antiparasitario durante el período de muestreo ($p_T = 0,001$).

5.3.1.2 Evaluación del desarrollo corporal de los grupos experimentales mediante peso corporal

La evolución temporal del peso de las terneras tratadas y controles se muestra en la figura 23.

El análisis estadístico mostró interacción tiempo x tratamiento ($p_{T*t}=0,001$). Además se observó un efecto del tiempo ($p_t=0,0001$). Las terneras que recibieron tratamiento antiparasitario mostraron mayor peso que las controles durante el período de muestreo ($p_T=0,019$) y el aumento en el peso corporal de las terneras tratadas con antiparasitarios con respecto a las controles se detectó a partir del mes 5 de vida ($p=0,04$) observándose un aumento progresivo hasta el mes 9 donde se detectaron las mayores diferencias ($p=0,001$) (Fig. 23).

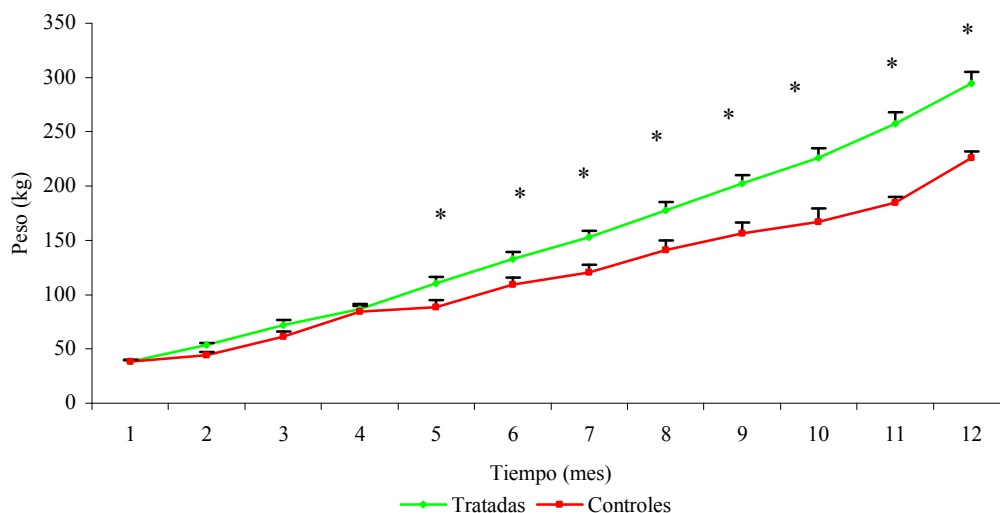


Figura 23. Pesos de los grupos tratados y controles a lo largo de un año. Las barras indican medias \pm SEM. La diferencia entre los mismos se hace significativa a partir del mes 5. *Indica $p < 0,05$.

5.3.1.3 Concentraciones séricas de IGF-1

Las concentraciones séricas promedio de IGF-1 evaluadas a las 20, 30, 40 y 70 semanas de vida en grupos tratados y controles se muestran en la figura 24. El análisis estadístico para las concentraciones séricas de IGF-1, de terneras tratadas y sin tratar, evaluadas a las 20, 30, 40 y 70 semanas de vida no mostró interacción significativa ($p_{T*t}=0,9$), mientras que sí se observó un efecto del tiempo de muestreo ($p_t=0,012$) y del tratamiento ($p_T=0,002$). Las terneras tratadas con antiparasitarios mostraron

mayores concentraciones de IGF-1 que las controles sin tratar, y a las 70 semanas de edad se observaron los mayores niveles séricos con respecto a las otras edades analizadas (post-hoc test $p < 0.05$).

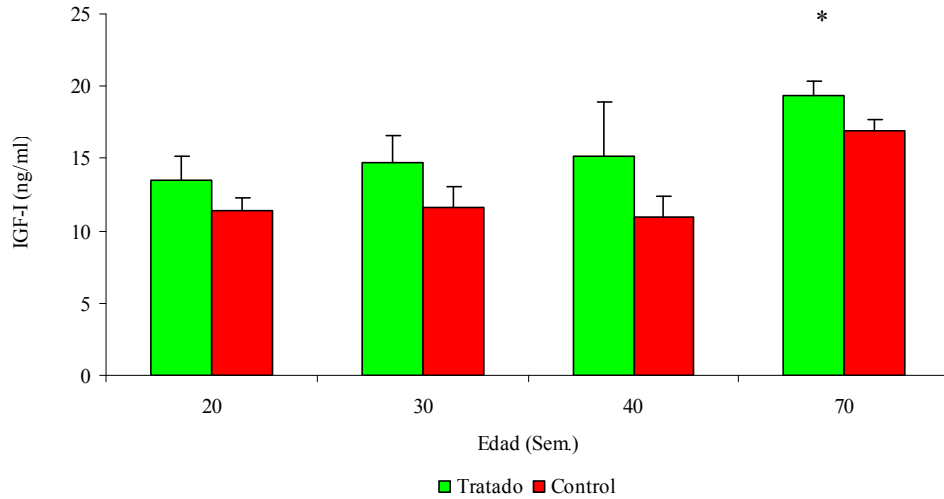


Figura 24. Medias de las concentraciones séricas de IGF-1 a las 20, 30, 40 y 70 semanas de edad de terneras tratadas con antiparasitarios (barra verde) y controles (barra roja) \pm SEM. *Indica $p < 0.05$.

5.3.1.4 Estado puberal

En la figura 25 se muestra la edad promedio a la cual las terneras tratadas y controles alcanzaron la pubertad, la cual correspondió a 34 semanas para tratadas y 38 para controles ($p=0,02$).

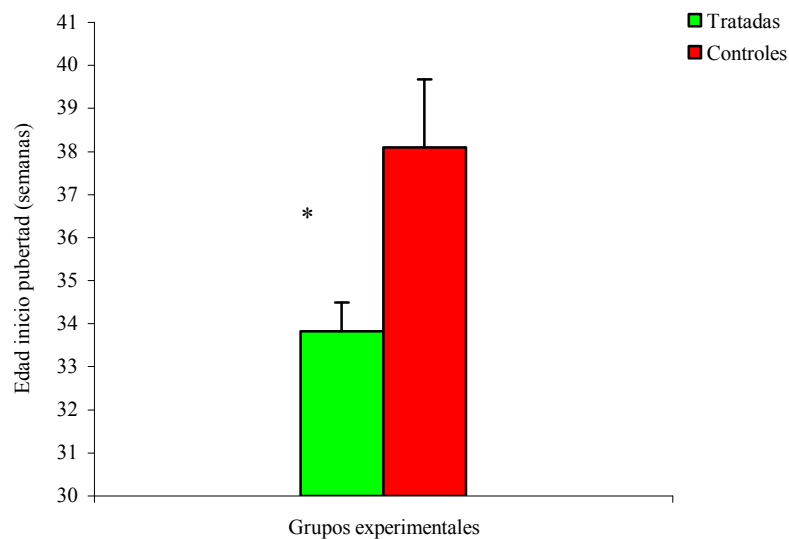


Figura 25. Edad promedio de entrada en la pubertad en semanas de los grupos tratados con antihelmínticos (verde) y controles (rojo). Medias \pm SEM. * Indica $p=0,02$.

La figura 26 muestra los porcentajes promedios de terneras púberes a cada uno de los tiempos analizados, revelándose diferencia en el porcentaje de individuos que entran en pubertad a las 20 y 40 semanas, resultando todas las terneras tratadas púberes a en este último tiempo ($p=0,0179$).

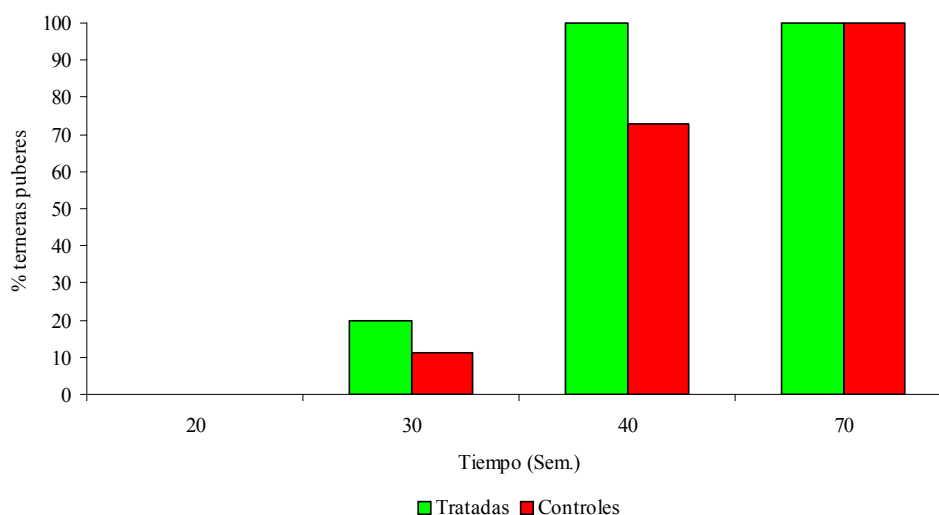


Figura 26. Porcentajes (%) promedios de terneras púberes de los grupos tratados con antihelmínticos (verde) y controles (rojo) a las 20, 30, 40 y 70 semanas de vida.

5.3.2 Influencia de los nematodos sobre el desarrollo de la glándula mamaria

En este apartado se describen las diferencias intramamarias derivadas de la comparación de terneras tratadas (con antihelmínticos) respecto a controles durante el desarrollo en los parámetros de: relación parénquima/estroma, proliferación celular, expresión de componentes del sistema de IGF y en la expresión de receptores de estrógenos alfa.

5.3.2.1 Relación parénquima/estroma

En la figura 27 se observan imágenes de cortes histológicos obtenidos a partir de biopsias de tejido mamario teñidas con hematoxilina/eosina, de terneras tratadas con antiparasitarios y controles a las 20, 30, 40 y 70 semanas de vida.

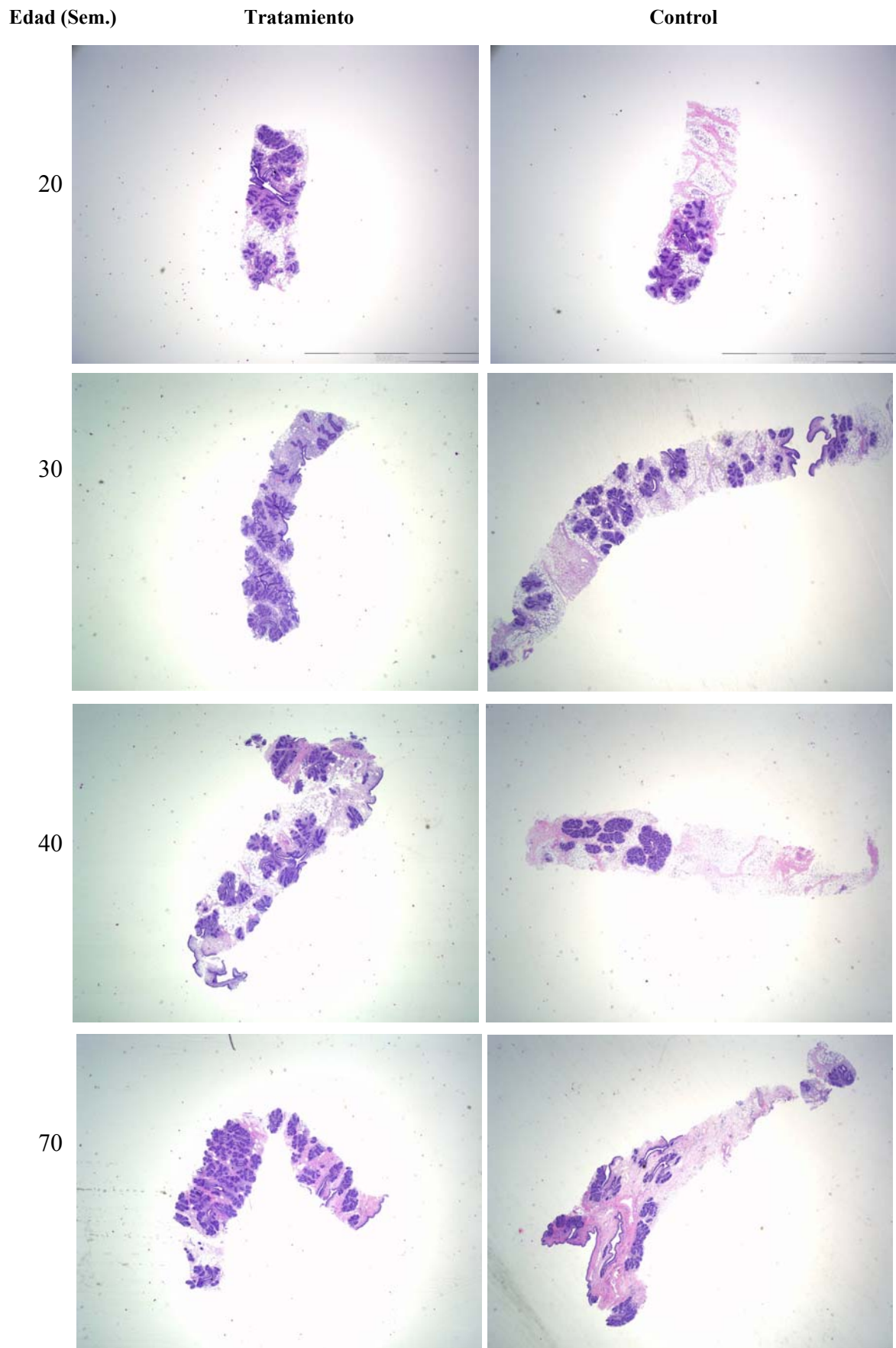


Figura 27. Biopsias de glándula mamaria de terneras tratadas con antiparasitarios y controles a las 20, 30, 40 y 70 semanas de vida. Coloración: Hematoxilina/eosina. X 200.

En la figura 28 se observan las proporciones de parénquima con respecto al tejido total en ambos grupos de terneras, a las cuatro edades estudiadas. El análisis comparativo entre tratamientos indicó una mayor proporción de parénquima en las glándulas mamarias de las terneras tratadas ($p_T=0,04$). No se encontraron diferencias temporales de inmunomarcación a nivel intragrupo (tratados, $p_{T1}=0,12$; controles, $p_{TC}=0,33$).

Cuando se evaluaron las diferencias entre tratadas y controles para cada edad, no se observaron diferencias en los porcentajes de parénquima entre tratados y controles en ninguna de ellas ($p_{20}=0,1$, $p_{30}=0,4$, $p_{40}=0,1$, $p_{70}=0,4$).

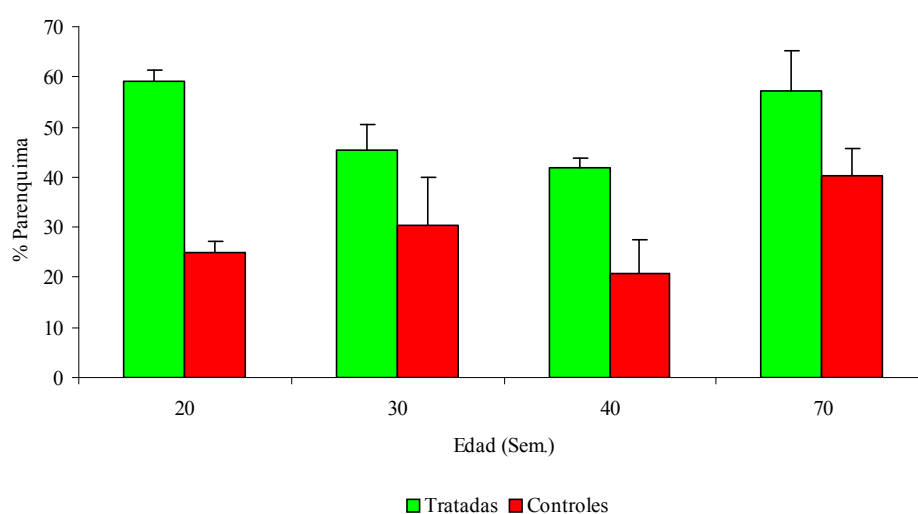


Figura 28. Porcentaje de parénquima en biopsias de glándula mamaria en animales tratados con antiparasitario y controles sin tratamiento a las 20, 30, 40 y 70 semanas de vida. Las barras representan las medias \pm SEM.

5.3.2.2 Proliferación celular mediante expresión de PCNA en tejido mamario

La proliferación celular en tejido mamario de terneras tratadas con antiparasitario y sin tratamiento a las 20, 30, 40 y 70 semanas de vida, evaluada mediante la expresión nuclear de PCNA, se muestra en la figura 29.

La marcación con el anticuerpo se evidenció en los núcleos de las células epiteliales y estromales, variando de débil a intensa (color marrón). Particularmente en las unidades ductales terminales (TDU) se observó marcación tanto en células epiteliales como en las mioepiteliales que rodean a los ductos (Fig. 29).

Las terneras tratadas con antiparasitarios mostraron, a las 20, 30, 40 y 70 semanas de vida, una tendencia ($p_T=0,08$) a presentar un promedio mayor de área

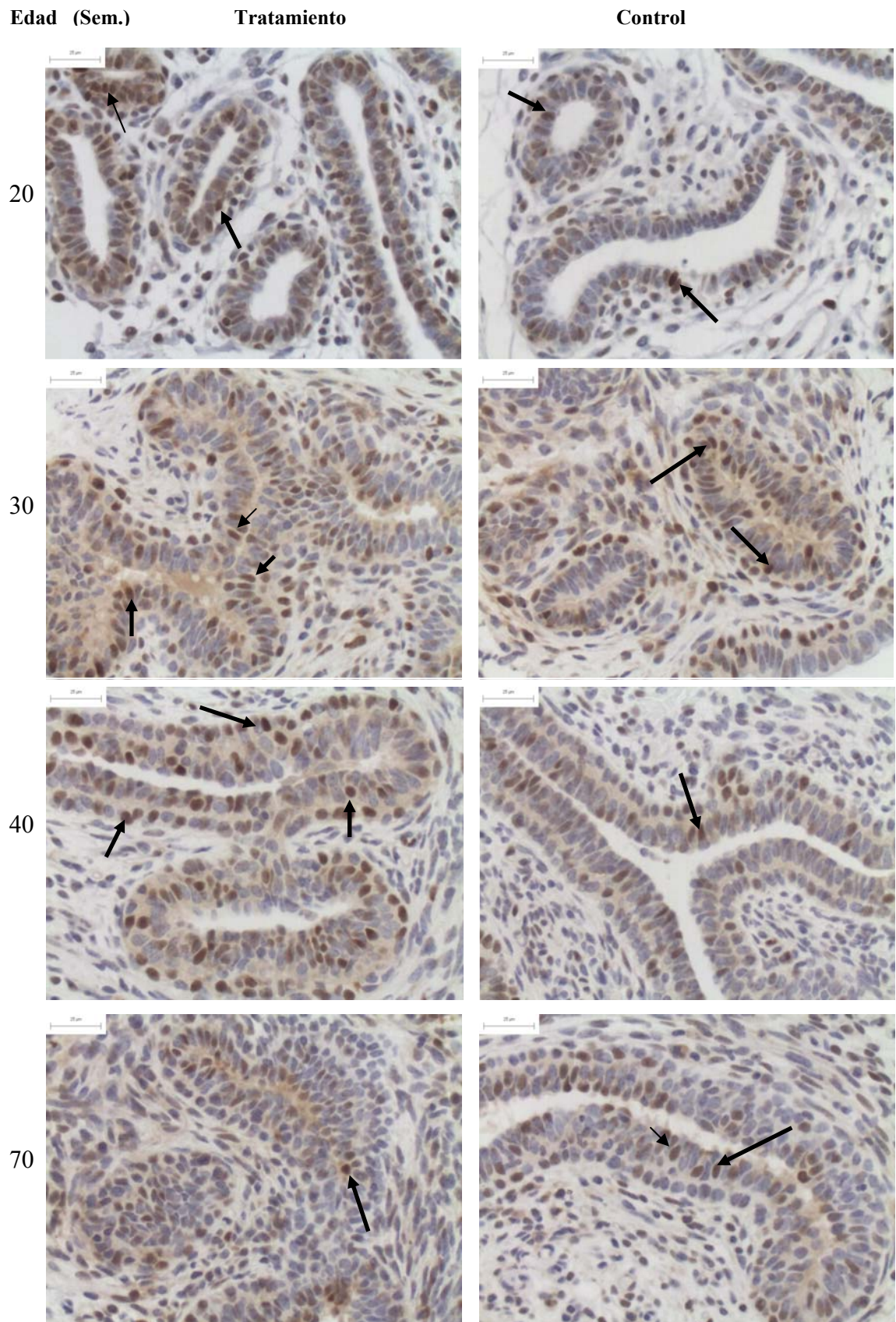


Figura 29. Inmunomarcación con anti-PCNA en glándula mamaria de terneras tratadas (izquierda) y controles (derecha) a las 20, 30, 40 y 70 semanas de edad. Las flechas indican núcleos de células PCNA intensamente marcadas (marrón) en el epitelio que reviste las unidades ductales terminales. X 400.

inmunomarcada para PCNA con respecto al grupo control (Fig. 30).

En la evaluación de la inmunomarcación a nivel intragrupo para todos individuos tratados y controles (por separado) a todos los tiempos, no se registró diferencias ($p_{tT}=0,42$, $p_{tC}=0,56$). Tampoco se observaron diferencias en los porcentajes de inmunomarcación para PCNA entre las hembras tratadas y controles a ninguna de las edades analizadas ($p_{20}=0,1$, $p_{30}=0,2$, $p_{40}=0,2$ $p_{70}=0,4$).

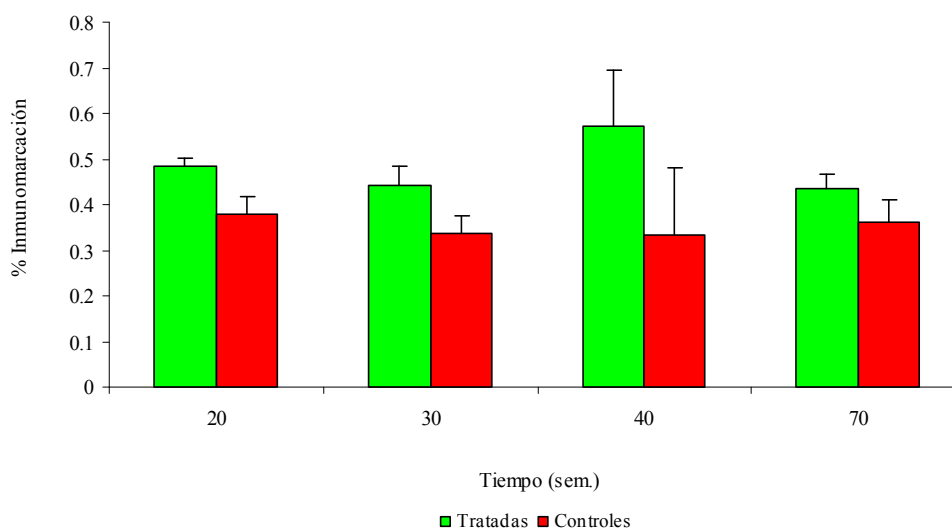


Figura 30. Porcentaje de área inmunomarcada con anti-PCNA asociado a parénquima de glándula mamaria de terneras tratadas con antiparasitario y controles sin tratamiento a las 20, 30, 40 y 70 semanas de vida. Las barras representan las medias \pm SEM.

5.3.2.3 Expresión de IGFBP-2 en tejido mamario

La figura 31 muestra en forma comparativa la inmunomarcación con anti IGFBP-2 en tejido mamario de terneras tratadas con antiparasitario y controles sin tratamiento. La expresión de IGFBP-2 en tejido mamario proveniente de terneras tratadas y controles se asoció a estructuras del parénquima y estroma mamario. Se observó reacción intensa a la inmunomarcación en el citoplasma de las células epiteliales que revisten los conductos mamaros. Células del estroma como fibroblastos y células endoteliales de los vasos sanguíneos también mostraron reacción intensa en su citoplasma; asimismo las fibras del tejido conectivo mostraron marcación positiva.

En la figura 32 se muestran los porcentajes de área inmunomarcada para IGFBP-2 en biopsias de glándula mamaria de terneras sometidas a tratamiento antiparasitario y en controles. El porcentaje de inmunomarcación en el tejido mamario de los

animales tratados varió con la edad mientras que en el de los controles permaneció prácticamente constante durante el desarrollo. Las terneras tratadas mostraron niveles máximos de inmunomarcación en la semana 40 de vida y mínimos en los extremos etarios analizados (20 y 70 semanas). El análisis estadístico mostró una disminución significativa en los porcentajes de inmunomarcación para IGFBP-2 en tejidos provenientes de hembras tratadas con antiparasitario durante el desarrollo con respecto a las hembras controles (no tratadas) ($p_T=0,04$).

La evaluación temporal a nivel intragrupo indicó que la inmunomarcación para IGFBP-2 de los individuos tratados, tendió a variar con el tiempo ($p_{tT}=0,06$), en tanto que en controles no se registró diferencia ($p_{tC}=0,98$). No se observaron diferencias en los porcentajes de marcación para IGFBP-2 entre hembras tratadas con antiparasitario y controles en ninguna de las edades analizadas separadamente ($p_{20}=0,1$, $p_{30}=0,2$, $p_{40}=0,7$ $p_{70}=0,1$).

5.3.2.4 Expresión de IGFBP-3 en tejido mamario

La expresión de IGFBP-3 en tejido mamario proveniente de terneras tratadas y controles se asoció a estructuras del parénquima y estroma mamario. La figura 33 muestra comparativamente la inmunomarcación con anti-IGFBP-3 para tejido mamario, de terneras tratadas con antiparasitario y controles sin tratamiento, durante el desarrollo. El tejido conectivo que rodea a los conductos mamarios reaccionó intensamente a la inmunomarcación al igual que el citoplasma de las células epiteliales que revisten los TDU. También se observó inmunorreacción en el citoplasma de las células endoteliales de los vasos sanguíneos y en los fibroblastos del tejido conectivo.

En la figura 34 se muestran los porcentajes de área inmunomarcada para IGFBP-3 en biopsias de glándula mamaria de terneras sometidas a tratamiento antiparasitario y en biopsias control. Los porcentajes de inmunomarcación en tejido de animales tratados no mostraron diferencias con respecto a los controles durante el desarrollo ($p_T=0,7$). No se observó un efecto del tiempo de muestreo en los porcentajes de inmunomarcación para IGFBP-3 a nivel intragrupo, ni para los individuos tratados con antiparasitarios ($p_{tT}=1$) ni para los controles ($p_{tC}=1$). El análisis en cada punto del tiempo (edades) no arrojó diferencias entre los grupos experimental analizados ($p_{20}=1$, $p_{30}=0,4$, $p_{40}=0,4$).

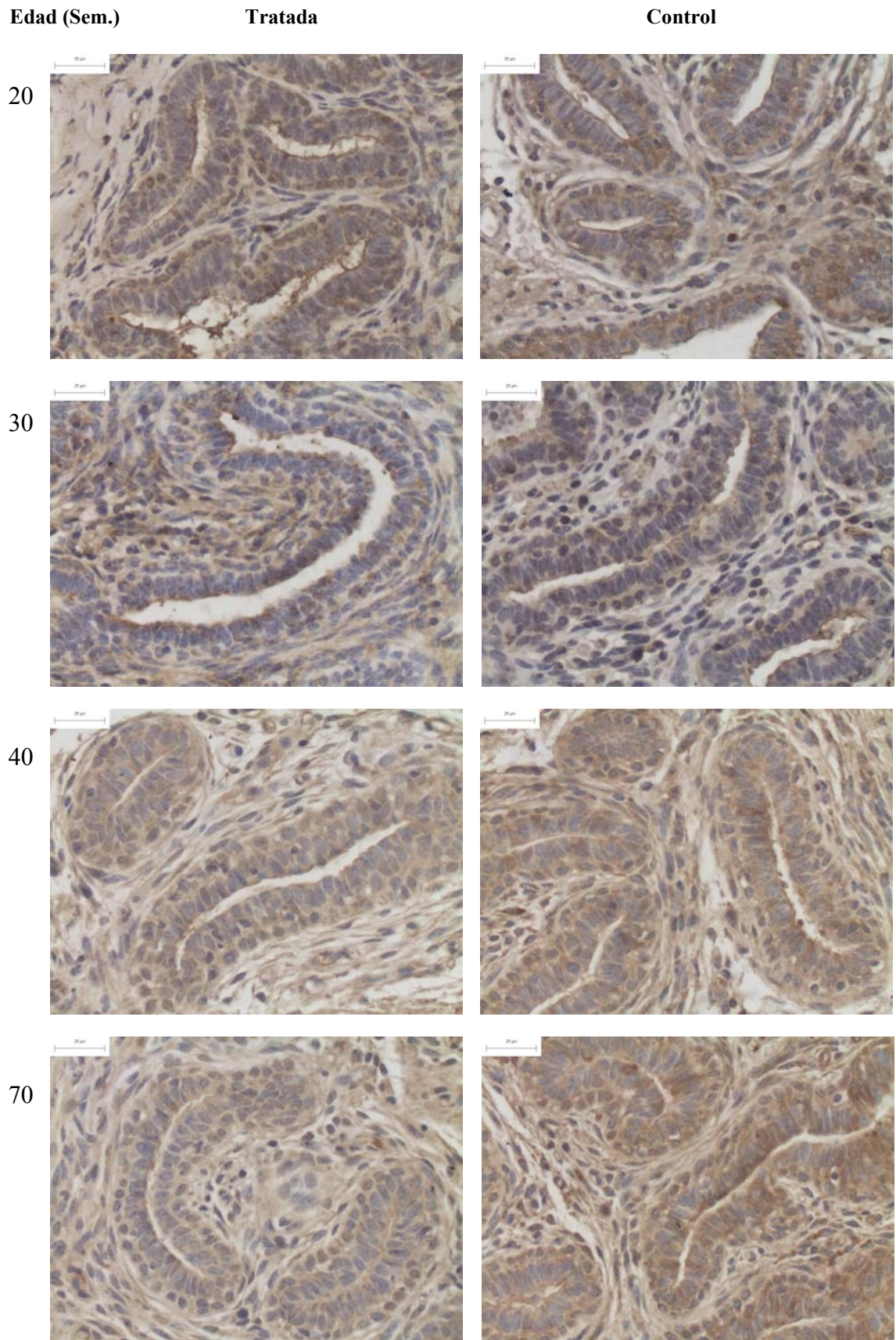


Figura 31. Inmunomarcación para IGFBP-2, en terneras tratadas con antiparasitario (izquierda) y controles sin tratamiento (derecha). Biopsias realizadas a las 20, 30, 40 y 70 semanas de vida. X 400.

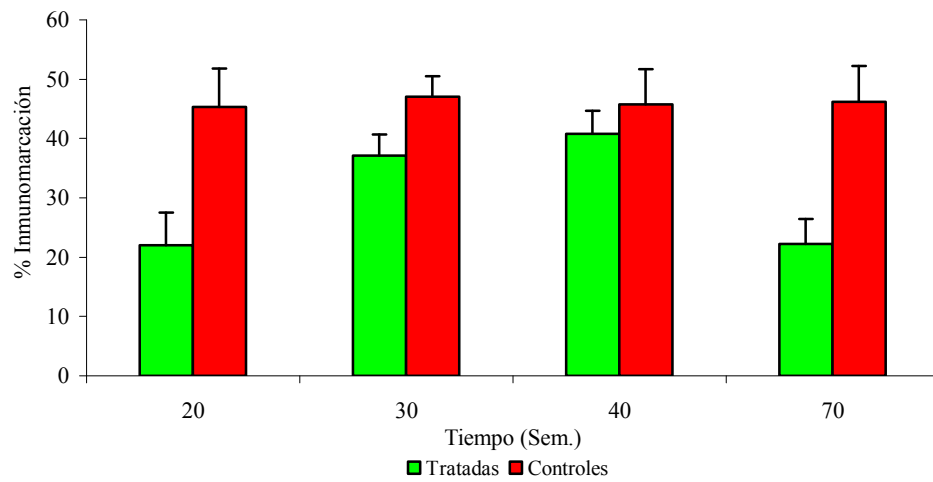


Figura 32. Porcentaje de inmunomarcación con anti-IGFBP-2 asociado a parénquima y estroma de glándula mamaria de terneras tratadas con antiparasitario y controles sin tratamiento a las 20, 30, 40 y 70 semanas de vida. Las barras representan las medias \pm SEM

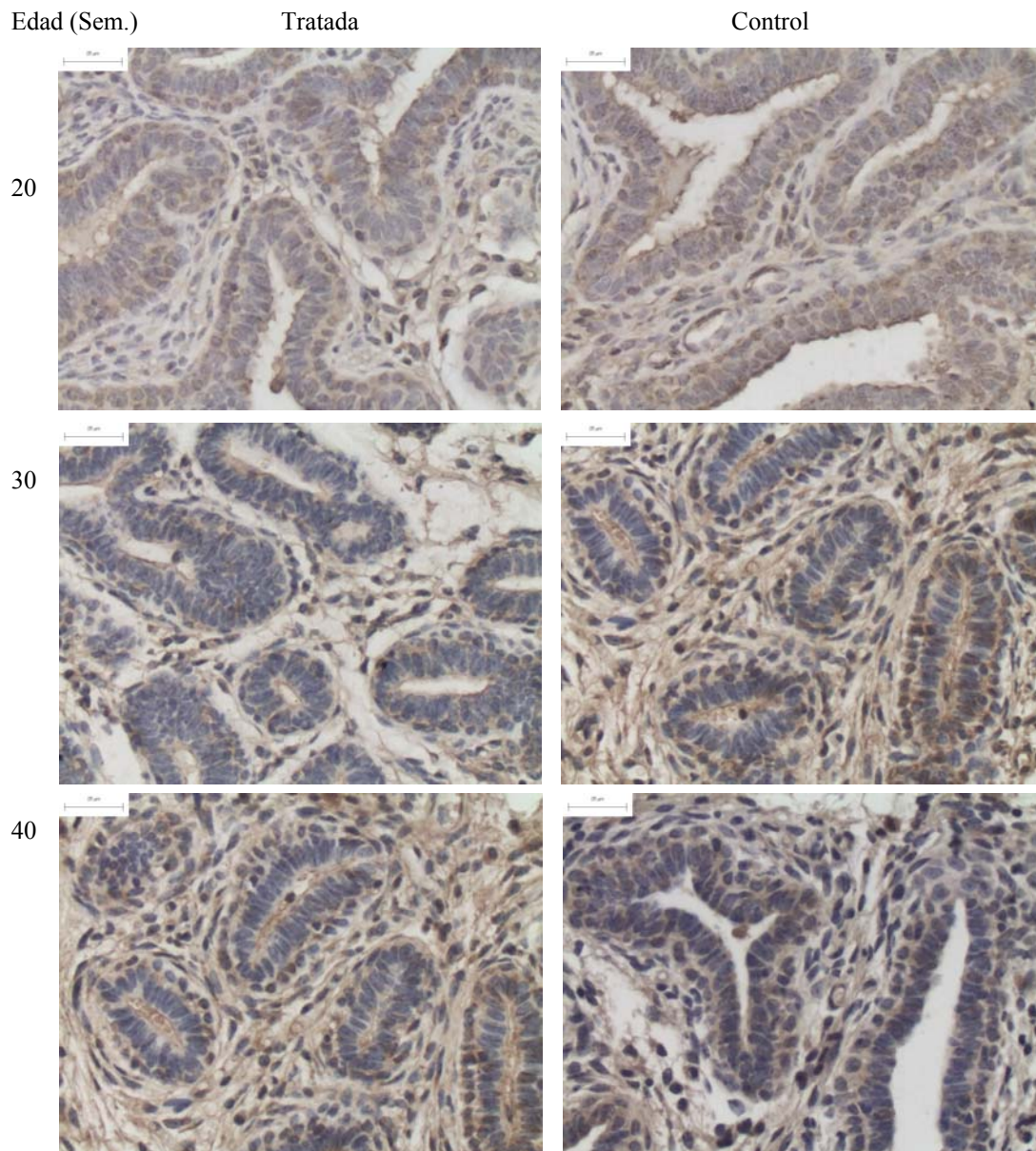


Figura 33. Inmunomarcación para IGFBP-3, en terneras tratadas con antiparasitario (izquierda) y controles sin tratamiento (derecha). Biopsias realizadas a las 20, 30 y 40 semanas de edad. X400.

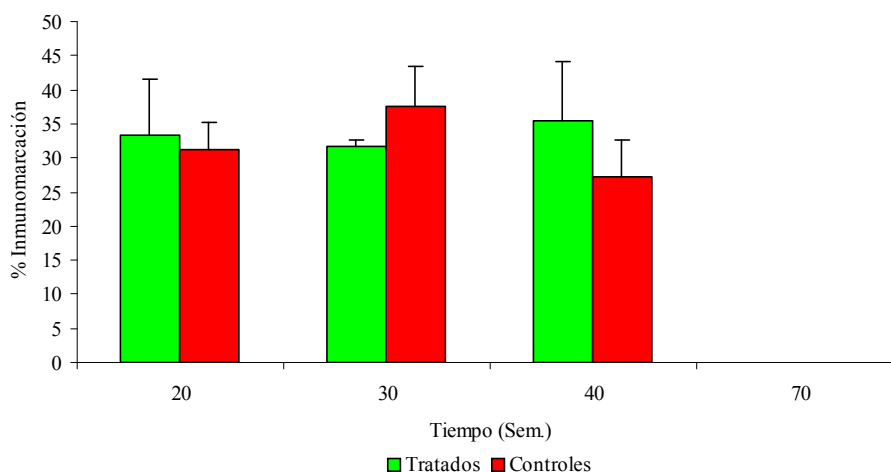


Figura 34. Porcentaje de inmunomarcación con anti-IGFBP-3 asociado a parénquima y estroma de glándula mamaria de terneras tratadas y controles sin tratamiento a las 20, 30 y 40 semanas de vida. Las barras representan las medias \pm SEM.

El análisis de IGFBP-3 no incluyó la semana 70 dado que cuando se cuantificó esta proteína (cronológicamente la última cuantificada de este trabajo) los tacos histológicos de biopsias pertenecientes a 3 terneras disponían de escaso material lo que tornó imposible una cuantificación comparativa.

5.3.2.5 Expresión de receptores de estrógeno alfa (ER- α) en tejido mamario

En la figura 35 se muestran comparativamente imágenes de tejido mamario marcado con anti-ER- α . En todos los períodos evaluados, se observó inmunomarcación en los núcleos de las células epiteliales ubicadas en posición medio-basal en el epitelio que reviste los TDU (marcación marrón). Las células mioepiteliales y estromales resultaron negativas a la inmunomarcación con anti-ER- α .

Los resultados de la inmunomarcación revelaron que el área marcada para ER- α fue superior en las terneras tratadas con antiparasitarios con respecto a las controles sin tratamiento para todos los períodos analizados en conjunto ($p_T=0,021$). El análisis de las terneras tratadas con antiparasitarios contemplando todas las edades, mostró efecto del factor tiempo ($p_{T1}=0,042$), en cambio para individuos controles no se detectó variación entre los tiempos ($p_{TC}=0,241$). La variación temporal en la expresión de ER- α observada en los individuos tratados, se vió reflejada en la variación de los promedios, hallándose tendencia creciente, con respecto al muestreo anterior, en la

expresión del receptor a las 30 semanas y tendencia decreciente a las 40 y 70 semanas de edad (Fig. 36).

El análisis en cada período de muestreo (edad) no arrojó diferencias entre hembras tratadas y controles ($p_{20}=0,2$, $p_{30}=0,1$, $p_{40}=0,2$, $p_{70}=1$).

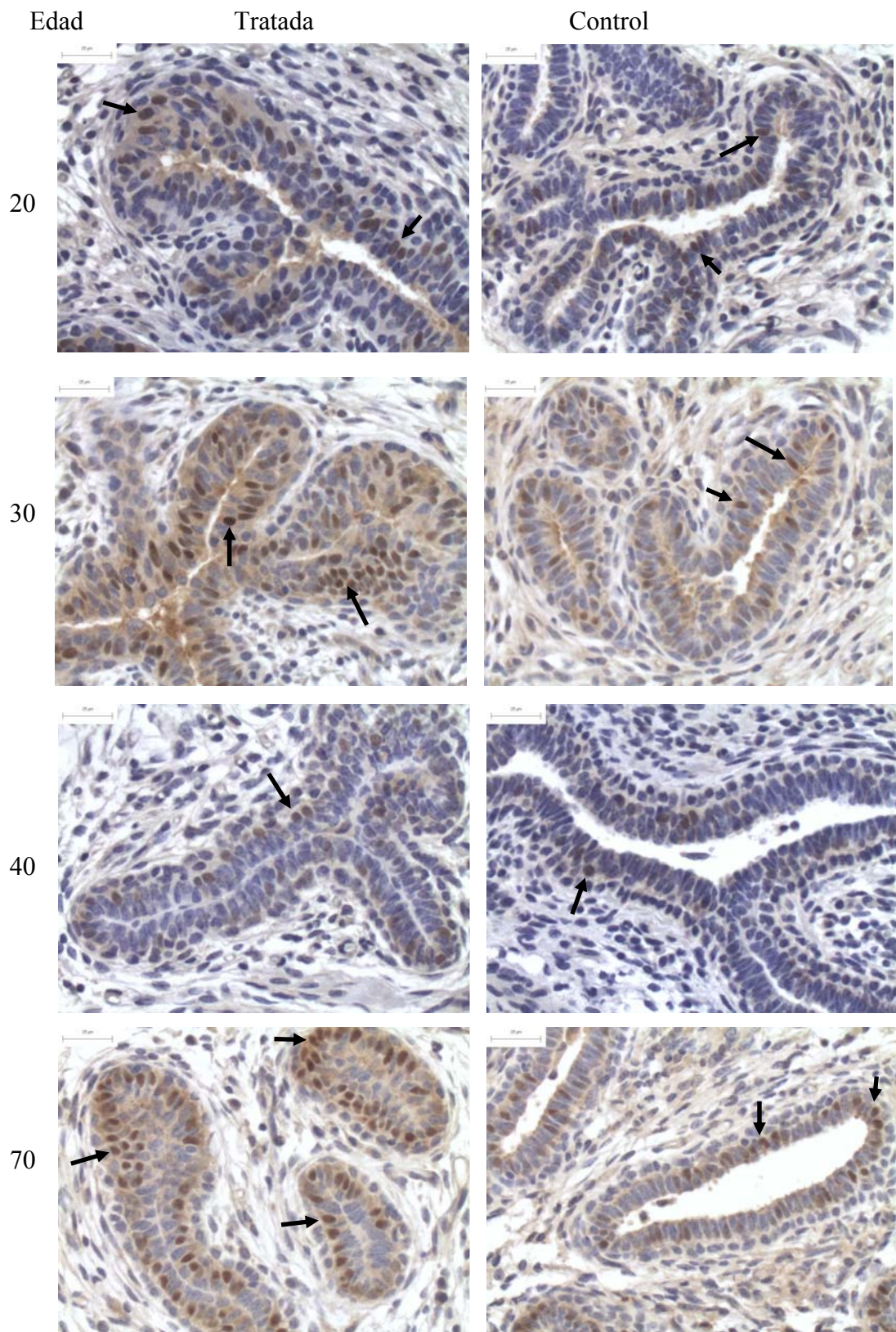


Figura 35. Inmunomarcación para receptor de estrógeno α , en terneras tratadas con antiparasitarios (izquierda) y controles sin tratamiento (derecha). Biopsias realizadas a las 20, 30, 40 y 70 semanas de edad. X400. Las flechas indican núcleos de células epiteliales inmunomarcados.

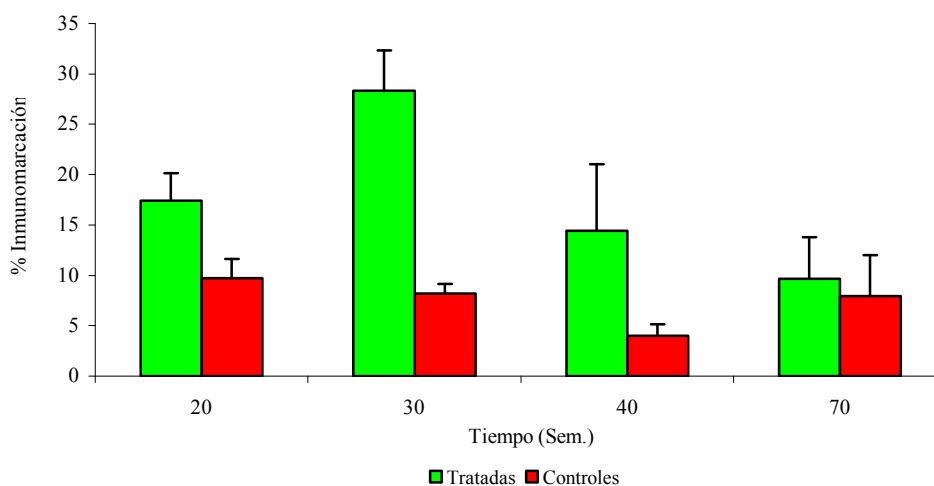


Figura 36. Porcentaje de área inmunomarcada con anti-ER- α asociado a parénquima de glándula mamaria de terneras tratadas con antiparasitario y controles sin tratamiento a las 20, 30, 40 y 70 semanas de edad. Las barras representan las medias \pm SEM.

5.3.3 Significancias estadísticas

A fin de clarificar los datos aportados por los análisis estadísticos a los que se sometieron los datos de los individuos pertenecientes al ensayo, se exponen en el siguiente cuadro todas las variables analizadas y las significancias calculadas para cada una de ellas.

Variables		Test F.	Test F.	Test F.	Test M-W	Test M-W	Test M-W	Test M-W
	Sig. estadística	P_T	P_{Tt}	P_{tC}	P_{20}	P_{30}	P_{40}	P_{70}
Parénquima/ estroma		0,04	0,12	0,33	0,1	0,4	0,1	0,4
PCNA		0,08	0,42	0,56	0,1	0,2	0,1	0,4
IGFBP-2		0,04	0,06	0,98	0,1	0,2	0,7	0,1
IGFBP-3		0,70	1	1	1	0,4	0,4	-----
ER- α		0,021	0,04	0,24	0,2	0,1	0,2	1

Tabla 4. Significancias calculadas para todas las variables analizadas. p_T : sig. del efecto tratamiento. p_{Tt} : sig. del efecto tiempo para el grupo tratado. p_{tC} : sig. del efecto tiempo para el grupo control. p_{20} : sig. a la semana 20 de la comparación de tratados y controles. p_{30} : sig. a la semana 30 de la comparación de tratados y controles. p_{40} : sig. a la semana 40 de la comparación de tratados y controles. p_{70} : sig. a la semana 70 de la comparación de tratados y controles. F=Friedman, M-W=Mann-Whitney.

5.4 Discusión y conclusión

5.4.1 Nivel sistémico

5.4.1.1 Conteo de huevos por gramo y desarrollo corporal

El número de huevos de nematodos encontrados en la materia fecal resulta un buen indicador del nivel de infección parasitaria en los animales (Gasbarre y col., 1996). En este trabajo no se registraron huevos de nematodos durante los primeros meses de muestreo, esto se debió a que en este momento los individuos experimentales pertenecían a la guachera (animales jóvenes de hasta 60 días de vida) que al no ingerir pasto (alimentados artificialmente) no se contaminan con nematodos. Este resultado es coincidente con lo reportado por (Mejía y col., 1999) para el mismo sitio geográfico y terneras de la misma edad y raza. En contraposición a lo descrito en el mencionado trabajo, se detectaron huevos de parásitos en animales tratados y controles (terneras de recría alimentadas con pasturas), probablemente por la pérdida de eficiencia de las drogas debido a la aparición de resistencia a las mismas entre las poblaciones de nematodos (Mejía y col., 2003).

Trabajos previos han demostrado que los tratamientos antihelmínticos realizados en terneras han resultado en una mayor ganancia de peso corporal (Larson y col., 1995; Purvis, y Whittier, 1996; Mejía y col., 1999). Se conoce además que los antiparasitarios no tienen una acción de crecimiento “per se” (Mejía y col., 1999), por lo que la ganancia de peso de los animales tratados se puede adjudicar a la baja carga parasitaria mantenida por los antihelmínticos. Los pesos medidos en los grupos experimentales del presente trabajo suman evidencia en el mismo sentido, indicando una fuerte influencia del tratamiento antiparasitario sobre la ganancia de peso corporal de las terneras. La disminución en la ganancia de peso observada en los animales que no recibieron tratamiento en comparación con los que sí lo recibieron, podría estar ocasionada por la presencia de nematodos gastrointestinales y al ya mencionado redireccionamiento energético mediado, entre otros, por las hormonas metabólicas alteradas.

5.4.1.2 Niveles séricos de IGF-1 y pubertad

Como es sabido la hormona del crecimiento (GH) lleva a cabo su actividad mediante IGF-1, el cual actúa como efector de GH (Yakar y col., 2005). En rumiantes, el incremento en la expresión de IGF-1 se vincula con períodos de rápido crecimiento (Hovey y col., 1998). Se ha descrito una correlación positiva entre el peso corporal de bovinos y la concentración sérica de IGF-1 (hasta los 100 kg) comparando terneras tratadas con antiparasitarios y controles sin tratamiento (Lacau-Mengido y col., 2000). En el presente trabajo se encontraron diferencias en las concentraciones de IGF-1 promedio entre grupos tratados y controles. El tiempo al que comienza la diferencia en peso corporal (5 meses) coincidió con el tiempo en el cual las concentraciones séricas de IGF-1 fueron significativamente mayores en los animales tratados con antiparasitario en relación a los controles. Lacau-Mengido y col. (2000) determinaron en muestreos más frecuentes que los aquí realizados, que las diferencias de las concentraciones séricas de IGF-1 entre grupos tratados y controles aparecen aproximadamente en la semana 20 de vida. En el presente trabajo, éste fue el momento elegido para el comienzo de los muestreos, encontrándose alterados los niveles de IGF-1, tal cual lo previsto (mayor concentración de IGF-1 en tratadas respecto a controles $p < 0,05$).

Además de lo mencionado, los tratamientos antiparasitarios en terneras se han asociado con el adelantamiento puberal y el mejoramiento de la fertilidad (Larson y col., 1995; Purvis y Whittier, 1996). Trabajos previos han sumado evidencia en la misma dirección comparando terneras tratadas con antihelmínticos y controles sin tratamiento (Lacau-Mengido y col., 2000). Los resultados del presente trabajo se encuentran en la misma sintonía, ya que terneras tratadas con antihelmínticos respecto a controles presentaron adelantamiento puberal de más de 4 semanas. Este hecho es de fundamental importancia en la producción ya que posibilita el adelanto de la vida productiva de los animales. Los cambios en las concentraciones séricas de IGF-1 previas a la pubertad son fuertemente influenciadas por el régimen nutricional (Granger y col., 1989). Informes reportados en terneras prepúberes con restricción alimentaria, revelaron que durante la realimentación de las mismas se incrementaban los niveles de IGF-1 (Yambayamba y col., 1996). El redireccionamiento de los nutrientes ingeridos por las terneras hacia el desarrollo de los parásitos podría impactar en la concentración de IGF-1 de manera análoga a la subnutrición. Para el

caso de infecciones con garrapatas se ha evidenciado también una marcada disminución de IGF-I, la cual se torna exacerbada en animales que poseen niveles nutricionales deprimidos (Tolleson y col., 2012). También se ha observado, que en bovinos afectados por garrapatas, disminuye de la expresión de los receptores de GH en hígado, y aumentan los niveles de cortisol (Tolleson y col., 2010). Si bien en el presente trabajo no hemos medido estos parámetros, es probable que estén alterados de manera similar, respondiendo al estrés parasitario, y que sean los causantes de la disminución de IGF-1 observada, dado que la principal fuente del IGF-I circulante es hepática y responde a la estimulación con GH. De manera adicional, se ha visto que alteraciones del eje adrenal con aumento del cortisol resultan en una inhibición de los niveles de GH (Savage y col., 2002; Ghizzoni y Mastorakos, 2003).

En cuanto a la evaluación del desarrollo mamario, las edades elegidas para los muestreos, representaron distintas fases del desarrollo puberal. A las 20 semanas, ninguna de las terneras había comenzado a ciclar, por lo que las muestras obtenidas fueron todas de glándulas prepuberales en ambos grupos. A las 30 semanas las primeras terneras estaban comenzando a ciclar, a las 40 todas las terneras del grupo tratado eran púberes no así las terneras controles, y a las 70 semanas ya todas habían alcanzado la pubertad.

Esto confiere un marco endocrino de importancia para la evaluación y discusión de los resultados obtenidos.

Los resultados de la primera parte de este capítulo (HPG, desarrollo corporal, pubertad) coincidieron con los hallazgos obtenidos por trabajos previos en animales sometidos a tratamiento antiparasitario y controles sin tratamiento.

Hasta aquí se ha descrito la influencia de los nematodos a nivel sistémico, en la próxima sección se discutirán posibles influencias de los mismos en parámetros particulares del desarrollo mamario.

5.4.2 Nivel local

5.4.2.1 Relación parénquima/estroma y proliferación celular (PCNA)

Como se describió anteriormente, los parásitos nematodos afectan de manera directa a las hembras en desarrollo, y pueden considerarse como un factor de

desequilibrio para el hospedador ya que parte de la energía ingerida por éste, se redirecciona hacia el aumento de la eficiencia biológica (del inglés, *Fitness*) del parásito, situación que resultaría análoga a la restricción alimentaria.

Trabajos realizados en cerdas prepúberes de 90 días de edad, han demostrado que una leve disminución en la cantidad de alimento no afecta el desarrollo mamario; sin embargo, una restricción alimentaria del 20% durante ese período disminuye la matriz grasa de la glándula mamaria en un 42% y el parénquima en un 26% (Farmer y col., 2004).

En cuanto a terneras prepúberes, ha sido bien documentado que la restricción alimentaria en el período prepuberal afecta la mamogénesis (Petitclerc y col., 1984; Capuco y col., 1995; Dobos y col., 2000). Por su parte Tucker, (Tucker, 1981) sostiene que el crecimiento y desarrollo mamario en terneras es crucial para la productividad, y que el número de células epiteliales mamarias es el principal factor determinante de la producción de leche. Estudios de la década del '90 sostienen que las afecciones ocurridas en el parénquima mamario durante el desarrollo puberal de terneras, afectan a futuras lactancias (Sejrsen, 1994); aunque falta sumar evidencias al respecto.

Estudios realizados en terneras de entre 2 y 8 semanas de edad indicaron que el aumento de energía y proteínas en la dieta indujo un incremento en la masa de parénquima mamario y la síntesis de ADN y ARN, incrementándose además, la velocidad de crecimiento corporal (Brown y col., 2005a; Brown y col., 2005b). En concordancia con estos resultados también se ha encontrado que terneras sometidas a dietas similares a la anterior, mostraron un incremento de la proliferación del epitelio mamario al llegar a los 100 kg de peso (respecto a controles), aunque durante el resto del crecimiento analizado (hasta los 350 kg) no se mantuvo la diferencia (Meyer y col., 2006).

Los resultados de la relación parénquima/estroma del presente trabajo demuestran que el tratamiento de las terneras con antiparasitarios ejerce un efecto significativo sobre los porcentajes de parénquima mamario en comparación con los animales que no recibieron tratamiento, observándose los menores porcentajes en estos últimos. A pesar de esto no se detectaron diferencias a nivel puntual (en cada uno de los tiempos), esto podría deberse a que el número de individuos analizados es bajo y el test (Mann-Whitney) no lograría resolver diferencias a pesar de las amplias

disparidades en promedios entre tratadas y controles (con un máximo de 34,47 puntos porcentuales de diferencia a las 20 semanas).

En relación a la proliferación celular, se observó una tendencia en el grupo de terneras tratadas a presentar mayor cantidad de células epiteliales en proliferación en comparación con las controles, si bien la misma no alcanzó el nivel de significancia estadística establecido. Sin embargo, tratándose de parámetros de comportamiento no normal, la tendencia mostrada resulta de importancia. Si bien en el presente estudio no se evaluaron los índices de apoptosis de las células epiteliales y estromales mamarias sería un dato complementario a considerar en futuros estudios, ya que modificaciones en los porcentajes de apoptosis de las células epiteliales en los animales que no recibieron tratamiento antiparasitario con respecto a los que sí lo recibieron podrían afectar la tasa de recambio celular perturbando en consecuencia el desarrollo mamario.

Estos resultados en su conjunto (proporción de parénquima y nivel de proliferación celular) indicarían un menor desarrollo mamario debido a la presencia aumentada de nematodos en las hembras que no recibieron tratamiento antiparasitario.

5.4.2.2 Expresión de componentes del sistema de IGF

Experimentos previos realizados en ratones hembras *knockout* para IGF-1 demostraron un menor desarrollo mamario en estos animales (Hadsell y Bonnette, 2000; Kleinberg y col., 2000). Por otra parte, la biodisponibilidad de IGF-1 está regulada por las proteínas ligadoras de IGF (IGFBPs) (6 proteínas en total) las cuales transportan, secuestran e incrementan la vida media del factor (Akers y col., 2005). Las mismas están presentes en el suero sanguíneo y en tejidos de vertebrados y su concentración está diferencialmente regulada según el tejido, la edad y el sexo del individuo (Cerro y col., 1993; Gatford y col., 1996; Collett-Solberg y Cohen, 1996). Existe escasa información respecto a la acción exacta de IGF-1 y sus proteínas de unión durante el desarrollo mamario prepuberal, pero está claro que ejercen un rol significativo (Akers y col., 2005).

Estudios realizados en ratones púberes, demostraron una expresión variable de IGFBP-2, -3, -4 y -5 en glándula mamaria y en suero con variaciones espacio temporales (Allar y Wood, 2004; Kleinberg y col., 2009). En bovinos, se ha detectado

expresión de diversas IGFBPs en la glándula mamaria (Weber y col., 2000; Plath-Gabler y col., 2001). Se ha demostrado que la expresión de las IGFBP-2 y -3 se evidencia en el parénquima y estroma mamario, mientras que IGFBP-5 se expresa en el estroma (Akers y col., 2005). En el presente trabajo, en concordancia con estos hallazgos, se demostró que la localización específica de IGFBP-2 y -3 evaluada por IHQ, se asoció tanto a componentes del estroma como del parénquima mamario.

La expresión variable y diferencial de las IGFBPs observada en la glándula mamaria de terneras tratadas con antiparasitario versus controles sin tratamiento, podría estar relacionada con su papel en la modulación del desarrollo tisular, probablemente regulando la acción de IGF-1, aunque no se descartarían acciones per-se de las mismas. Por ejemplo, en modelos experimentales de ratón se determinó que un aumento de expresión hepática de IGFBP-2 durante el desarrollo fetal retarda el crecimiento del mismo (Tapanainen y col., 1994). Por otro lado, en conejos transgénicos que sobre-expresan IGF-1 humano en la glándula mamaria, no se detectaron alteraciones fenotípicas en la misma pero sí se detectó un aumento significativo de la expresión de IGFBP-2, este exceso podría explicarse como un efecto amortiguador, por parte de la IGFBP-2, sobre IGF-1 (Wolf y col., 1997). En concordancia con lo antes mencionado, se determinó que ratones transgénicos que expresan IGF-1 modificado (con reducida afinidad por IGFBPs) mostraron severos cambios en la glándula mamaria, como por ejemplo hiperplasia ductal e involución deficiente luego de la lactancia (Hadsell y col., 1996). Por otra parte, en ratones transgénicos que sobre-expresan IGFBP-2 se detectó una disminución significativa del peso corporal, principalmente debida a una reducción del crecimiento del esqueleto (Hoeflich y col., 1998).

La IGFBP-2 a nivel sérico ha sido asociada con diversas condiciones patológicas en humanos, como diabetes mellitus, falla renal crónica, cirrosis hepática y ciertos tipos de leucemia (Blum y col., 1993). Complementando esta información se ha demostrado que IGFBP-2 aumenta en la deficiencia congénita de GH y durante la anorexia nerviosa, mientras que disminuye en pacientes obesos (Barrios y col., 2000). Por otro lado, en sueros provenientes de cerdos infectados con *Sarcocystis miescheriana* se ha observado un aumento de las concentraciones IGFBP-1, -2 y -4 (Prickett y col., 1992).

En cuanto a las funciones moduladoras de IGF-1 por parte de IGFBP-3, se han descrito efectos contrapuestos (estimulatorios e inhibitorios) dependiendo del diseño

experimental (Berry y col., 2001). Además, se han determinado características no necesariamente relacionadas con su capacidad para modificar la acción de IGF-1 (Blum y Baumrucker, 2002), como por ejemplo su abundancia en secreciones mamarias (leche) y su capacidad de interactuar con lactoferrina favoreciendo el mecanismo de apoptosis. Estas interacciones ocurren probablemente durante el desarrollo mamario (previo a la lactancia) y durante la involución post-lactancia (Blum y Baumrucker, 2002).

Los resultados de este trabajo en cuanto a los porcentajes de inmunomarcación para IGFBP-2, indicaron que las terneras controles presentaron valores mayores de expresión de esta proteína de unión en comparación con las tratadas. Teniendo en cuenta que existen evidencias de que esta proteína se encuentra ligada al desarrollo de ciertas patologías, podría ser que la tendencia aquí observada sea causada por elevadas cargas de parásitos nematodos. Tampoco se puede descartar un efecto directo de la disminución de IGF-1 sobre la regulación de la síntesis de la proteína. En cuanto a la IGFBP-3, a pesar de ser la más abundante a nivel sistémico, o justamente a causa de ello, y tener síntesis endógena en la glándula mamaria bovina (Weber y col., 2000), no se registraron diferencias en los porcentajes de inmunomarcación para esta proteína de unión entre animales tratados con antiparasitarios y controles en este trabajo de tesis.

5.4.2.3 Expresión del receptor de estrógeno alfa (ER- α)

Los esteroides ováricos se incrementan con el inicio de la pubertad, momento en el que también comienza el crecimiento alométrico de la glándula mamaria. Se ha establecido que, en particular, la elongación de los ductos es estimulada por estradiol que actúa, a nivel glandular, sobre receptores de estrógenos (Korach y col., 1996; Fendrick y col., 1998). De este último existen dos isoformas ER- α y ER- β ; en el caso de glándula mamaria bovina, la isoforma alfa (ER- α) es la que predomina en el tejido (Schams y col., 2003; Connor y col., 2005; Meyer y col., 2007). Estudios realizados en ratones, demostraron que los ER- α estromales son indispensables para el crecimiento ductal epitelial (Cunha y col., 1997). Tanto los ER- α estromales como los epiteliales, junto con los receptores de progesterona, son necesarios para el normal desarrollo mamario (Mueller y col., 2002). Sin embargo, aunque presentes en estroma

y epitelio mamario de recién nacidos, los ER- α son insensibles a la administración de estradiol no obteniéndose respuesta de proliferación epitelial con la aplicación exógena de la hormona en esta etapa (Haslam, 1889; Imagawa y col., 1990; Curtis y col., 1999).

Posteriormente, en el período inmediatamente anterior al inicio de la pubertad, la expresión de ER- α aumenta significativamente en el estroma y la glándula mamaria se torna sensible al estrógeno (Mueller y col., 2002).

Estudios realizados en glándula mamaria bovina utilizando inmunohistoquímica para detectar ER- α , han demostrado que la expresión de este receptor se restringe al parénquima de la glándula mamaria y está enteramente confinado al epitelio que reviste los conductos, con infrecuente expresión en células estromales (Capuco y col., 2002; Berry y col., 2003). Esta observación ha sido confirmada por RT-PCR cuantitativa a partir de ARN aislado de células epiteliales y estromales obtenidas por microdissección con láser (Capuco y col., 2002). Aproximadamente un tercio de las células epiteliales expresan ER- α (Capuco y col., 2002) y esta expresión está primeramente asociada a las células embebidas en el epitelio, es decir, entre las que se localizan inmediatamente en contacto con la membrana basal (basales) y las que están en contacto con la luz del conducto (luminales) (Capuco y Ellis, 2005). En el presente trabajo, en coincidencia con los trabajos antes citados, la expresión del ER- α se detectó en los núcleos de las células epiteliales que revisten los TDU, fundamentalmente en las que se ubican en posición medio-basal.

La transcripción de ER- α aumenta hasta aproximadamente los 100 kg de peso (en bovinos) (Meyer y col., 2007) paralelamente al aumento de los niveles de IGF-1, para luego decrecer en momentos cercanos a la pubertad (Connor y col., 2005; Meyer y col., 2007), cuando ya los valores del factor se estabilizan. En el presente trabajo, se determinó que las hembras tratadas con antiparasitarios presentaron mayores porcentajes de marcación de ER- α durante el desarrollo que las que no recibieron tratamiento. Esto probablemente esté relacionado con el aumento de IGF-1, tanto sistémico como biodisponible en la glándula de estas terneras, que regularía positivamente la expresión del receptor (Imagawa y col 1990., Woodward y col., 1998).

Se observó además, para el grupo tratado, una fluctuación temporal en la marcación del receptor, presentándose un aumento a las 30 semanas de vida lo cual se correspondió con un peso promedio de 135 kg y con un 20 % de terneras ciclantes.

Entre las 30 y 40 semanas de vida, el 100 % de las terneras de este grupo alcanzaron la pubertad. En las semanas posteriores, la inmunomarcación de ER- α disminuyó cuando ya todas las terneras eran púberes, este comportamiento es similar al reportado en trabajos previos, (Connor y col., 2005; Meyer y col., 2007) difiriendo aproximadamente en un 30 % respecto al peso descripto por estos autores, que no mencionan el porcentaje de terneras que estaban ciclando. Esta diferencia podría asignarse justamente a la diferente etapa madurativa de los animales, que resulta en diferentes entornos hormonales (principalmente estradiol) de la glándula. Además, la naturaleza diferencial de los experimentos podría también explicarla, ya que las mencionadas investigaciones se han realizado aplicando distintos planes nutricionales a los grupos experimentales; y si bien, como antes se comentó, las parasitosis causan consecuencias similares a la restricción alimentaria no necesariamente afectan cualitativa y cuantitativamente del mismo modo.

Los porcentajes de marcación para ER- α correspondientes a animales controles denotaron escasa variación a lo largo del tiempo, mostrando valores similares en todas las edades analizadas. La escasa variación observada en la expresión del receptor en estos animales podría estar relacionada con (además de los bajos niveles de IGF-1 circulantes sumados al mayor secuestro del mismo por las mayores concentraciones de IGFBP2) los momentos de muestreo elegidos. Si el aumento de receptores fue más tardío que en el otro grupo, y de menor cuantía, es posible que no se los haya encontrado en los momentos muestreados.

Debe considerarse que a pesar de las discrepancias promediales a nivel puntual no se hallaron diferencias entre los grupos a ninguno de los tiempos analizados, podría ser una posible causa de este fenómeno el bajo número de individuos analizados y el tipo de test estadísticos que si bien permiten trabajar con estas cantidades (3 por grupo experimental) sacrifican precisión en el proceso.

5.4.3 Conclusión general

Los resultados expuestos en el presente capítulo mostraron un menor desarrollo mamario en las terneras sin tratamiento antiparasitario. Estos hallazgos podrían deberse a la menor concentración sistémica de IGF-1 observada en este grupo de animales, sumada a la expresión incrementada de IGFBP-2 en el tejido mamario que podría interferir en el secuestro local de IGF-1, resultando en menor cantidad de

factor biodisponible en la glándula. Como se mencionó anteriormente, IGF-1 es un factor mitogénico esencial para el crecimiento de los tejidos. Una menor concentración de IGF-1 circulante durante la etapa prepuberal, etapa de activa división celular en la glándula mamaria, resultaría en una menor activación de dicha proliferación, por lo que estos resultados probablemente también puedan explicar la diferencia significativa observada en la relación parénquima/estroma y la tendencia diferencial en la proliferación celular registrada entre los animales tratados con respecto a los controles. Por otra parte, se ha visto que el IGF-1 es, además, inductor de receptores de estradiol lo que estaría de acuerdo con la observación de una menor expresión de los mismos en la glándula mamaria de las terneras controles (que tienen menor IGF-1). Esto a su vez redundaría en un menor efecto del estradiol, (especialmente necesario para la mamogénesis en la etapa prepuberal) en el desarrollo mamario de estos animales, lo que se sumaría al efecto anterior.

Si se consideran las significancias en todas las edades de muestreo analizadas (p_{20} , p_{30} , p_{40} , p_{70}) de las variables parénquima/estroma, PCNA, IGFBP-2 y ER- α ; se puede observar que alrededor de la semana 20 de vida, aunque no se observe significancia estadística, los valores absolutos en esta fecha son menores o iguales al resto de los tiempos, señalando probablemente un especial retardo en el desarrollo de la glándula mamaria por la presencia de parásitos nematodos en la etapas tempranas del desarrollo, cuando la pubertad se está preparando. Probablemente el número de individuos analizados limite las pruebas estadísticas a la hora de revelar diferencias entre los grupos experimentales a tiempos particulares, ya que empleando un N bajo el test se torna muy exigente al momento de hallar diferencias significativas, sobre todo considerando el comportamiento no normal de estas variables.

Como se ha mencionado para otras especies, el período inicial de la vida postnatal es especialmente sensible a la disminución de la ingesta energética. Teniendo en cuenta este concepto, los resultados expuestos en este capítulo podrían ser indicadores del redireccionamiento de la energía ingerida por el hospedador hacia los parásitos, en desmedro del desarrollo mamario; situación que se tornaría más evidente a las 20 semanas de vida.

Capítulo 6: Resumen de conclusiones

En el presente trabajo de tesis se encontró que los nematodos gastrointestinales afectan a animales adultos en parámetros productivos y reproductivos mientras que los animales jóvenes (quienes presentan las mayores cargas parasitarias) se vieron afectados en parámetros concernientes al desarrollo.

Entre las afecciones más destacadas en animales adultos con altas cargas parasitarias, se encuentra la menor producción de leche y la menor concentración de hormonas relacionadas con la lactogénesis (GH, IGF-1 y prolactina).

En cuanto a animales en desarrollo (terneras) la influencia de los nematodos gastrointestinales se revela por medio del menor desarrollo corporal, menor concentración sérica de IGF-1 y retraso puberal.

En el desarrollo particular de la glándula mamaria en individuos con tratamiento antiparasitario se halló mayor proporción de parénquima mamario, indicios de mayor proliferación celular, mayor inmunomarcación para receptores de estrógeno y menor inmunomarcación para IFGBP-2.

Todas las afecciones aquí descritas se relacionan fundamentalmente con el redireccionamiento de recursos energéticos que se suceden en la relación hospedador-parásito en donde el primero maximiza su eficiencia biológica mientras que el hospedador asume los costos energéticos. Algunas de las observaciones son la consecuencia inmediata del mismo, como los trastornos de desarrollo o productivos observados, y otras forman parte de los mecanismos fisiológicos involucrados, como las alteraciones endócrinas en hormonas, receptores y moduladores hormonales.

Bibliografía

Agrawal, A. K. y B. H. Shapiro, 2001, Intrinsic signals in the sexually dimorphic circulating growth hormone profiles of the rat: *Mol.Cell Endocrinol.*, v. 173, no. 1-2, p. 167-181.

Akers, R. M., 2000, Selection for milk production from a lactation biology viewpoint: *J.Dairy Sci.*, v. 83, no. 5, p. 1151-1158.

Akers, R. M., S. E. Ellis y S. D. Berry, 2005, Ovarian and IGF-I axis control of mammary development in prepubertal heifers: *Domest.Anim Endocrinol.*, v. 29, no. 2, p. 259-267.

Allar, M. A. y T. L. Wood, 2004, Expression of the insulin-like growth factor binding proteins during postnatal development of the murine mammary gland: *Endocrinol.*, v. 145, no. 5, p. 2467-2477.

Allen, J. E. y R. M. Maizels, 2011, Diversity and dialogue in immunity to helminths: *Nat.Rev.Immunol.*, v. 11, no. 6, p. 375-388.

Allen, J. E. y T. A. Wynn, 2011, Evolution of Th2 immunity: a rapid repair response to tissue destructive pathogens: *PLoS.Pathog.*, v. 7, no. 5, p. e1002003.

Ambrustolo, R. R., G. M. Bulman, E. J. Segura, B. Beckwith y J. Guerrero, 1990, Helminth control and its relation to parameters of breeding fitness in replacement heifers in the humid pampas of Argentina.: *Veterinaria Argentina*, v. 7, p. 92-98.

Amour, J. y C. Osbourn , 1982, Bovine Ostertagiasis: A review and annotated bibliography. Miscellaneous publications N 7.Commonwealth Institute of Parasitology, Engalnd..

Anthony, R. M., L. I. Rutitzky, J. F. Urban, Jr., M. J. Stadecker y W. C. Gause, 2007, Protective immune mechanisms in helminth infection: *Nat.Rev.Immunol.*, v. 7, no. 12, p. 975-987.

Aronica, S. M. y B. S. Katzenellenbogen, 1993, Stimulation of estrogen receptor-mediated transcription and alteration in the phosphorylation state of the rat uterine estrogen receptor by estrogen, cyclic adenosine monophosphate, and insulin-like growth factor-I: *Mol.Endocrinol.*, v. 7, no. 6, p. 743-752.

Artis, D. y col., 2004, RELMbeta/FIZZ2 is a goblet cell-specific immune-effector molecule in the gastrointestinal tract: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 101, no. 37, p. 13596-13600.

Ballagh, K., N. Korn, L. Riggs, S. L. Pratt, F. Dessauge, R. M. Akers y S. Ellis, 2008, Hot topic: Prepubertal ovariectomy alters the development of myoepithelial cells in the bovine mammary gland: *J.Dairy Sci.*, v. 91, no. 8, p. 2992-2995.

Barrios, V., M. Buno, J. Pozo, M. T. Munoz y J. Argente, 2000, Insulin-like growth factor-binding protein-2 levels in pediatric patients with growth hormone deficiency, eating disorders and acute lymphoblastic leukemia: *Horm.Res.*, v. 53, no. 5, p. 221-227.

Bartella, V., M. P. De, R. Malaguarnera, A. Belfiore y M. Maggiolini, 2012, New advances on the functional cross-talk between insulin-like growth factor-I and estrogen signaling in cancer: *Cell Signal.*

Barger, I. A., 1993, Influence of sex and reproductive status on susceptibility of ruminants to nematode parasitism: *Int.J.Parasitol.*, v. 23, no. 4, p. 463-469.

Bauman, D. E., 1999, Bovine somatotropin and lactation: from basic science to commercial application: *Domest.Anim Endocrinol.*, v. 17, no. 2-3, p. 101-116.

Becu-Villalobos, D., I. Garcia-Tornadu, G. Shroeder, E. E. Salado, G. Gagliostro, C. Delavaud, Y. Chilliard y I. M. Lacau-Mengido, 2007, Effect of fat supplementation on leptin, insulin-like growth factor I, growth hormone, and insulin in cattle: *Can.J.Vet.Res.*, v. 71, no. 3, p. 218-225.

Begon, M., C. R. Townsend y J. L. Harper, 2006, *Parasitism and Disease., ECOLOGY. From Individuals to Ecosystems.*: Cydney, Blackwell Publishing Ltd, ed, p. 347-380.

Beleut, M., R. D. Rajaram, M. Caikovski, A. Ayyanan, D. Germano, Y. Choi, P. Schneider y C. Brisken, 2010, Two distinct mechanisms underlie progesterone-induced proliferation in the mammary gland: *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A.*, v. 107, no. 7, p. 2989-2994.

Berry, S. D., P. M. Jobst, S. E. Ellis, R. D. Howard, A. V. Capuco y R. M. Akers, 2003, Mammary epithelial proliferation and estrogen receptor alpha expression in prepubertal heifers: effects of ovariectomy and growth hormone: *J.Dairy Sci.*, v. 86, no. 6, p. 2098-2105.

Berry, S. D., T. B. McFadden, R. E. Pearson y R. M. Akers, 2001, A local increase in the mammary IGF-1: IGFBP-3 ratio mediates the mammogenic effects of estrogen and growth hormone: *Domest.Anim Endocrinol.*, v. 21, no. 1, p. 39-53.

Biondani, C. A. y P. E. Steffan, 1988, Efecto de las parasitosis gastrointestinales sobre la producción láctea en rodeos lecheros: *Vet.Arg.*, v. 42, p. 115-127.

Blanchard, J. L., A. M. Gallina y R. B. Wescott, 1986, Pathologic changes in lambs with *Ostertagia circumcincta* infections associated with decreased infectivity of *Haemonchus contortus*: *Am.J.Vet.Res.*, v. 47, no. 2, p. 309-314.

Blum, J. W. y C. R. Baumrucker, 2002, Colostral and milk insulin-like growth factors and related substances: mammary gland and neonatal (intestinal and systemic) targets: *Domest.Anim Endocrinol.*, v. 23, no. 1-2, p. 101-110.

Blum, W. F., N. Horn, J. Kratzsch, J. O. Jorgensen, A. Juul, D. Teale, K. Mohnike y M. B. Ranke, 1993, Clinical studies of IGFBP-2 by radioimmunoassay: *Growth Regul.*, v. 3, no. 1, p. 100-104.

Bocchinfuso, W. P. y K. S. Korach, 1997, Mammary gland development and tumorigenesis in estrogen receptor knockout mice: *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.*, v. 2, no. 4, p. 323-334.

Bonnette, S. G. y D. L. Hadsell, 2001, Targeted disruption of the IGF-I receptor gene decreases cellular proliferation in mammary terminal end buds: *Endocrinol.*, v. 142, no. 11, p. 4937-4945.

Brown, E. G., M. J. Vandehaar, K. M. Daniels, J. S. Liesman, L. T. Chapin, J. W. Forrest, R. M. Akers, R. E. Pearson y M. S. Nielsen, 2005a, Effect of increasing energy and protein intake on mammary development in heifer calves: *J.Dairy Sci.*, v. 88, no. 2, p. 595-603.

Brown, E. G., M. J. Vandehaar, K. M. Daniels, J. S. Liesman, L. T. Chapin, D. H. Keisler y M. S. Nielsen, 2005b, Effect of increasing energy and protein intake on body growth and carcass composition of heifer calves: *J.Dairy Sci.*, v. 88, no. 2, p. 585-594.

Buonomo, F. C. y C. A. Baile, 1990, The neurophysiological regulation of growth hormone secretion: *Domest.Anim Endocrinol.*, v. 7, no. 4, p. 435-450.

Capron, M., G. A. Soussi, M. Morita, M. J. Truong, L. Prin, J. P. Kinet y A. Capron, 1995, Eosinophils: from low- to high-affinity immunoglobulin E receptors: *Allergy*, v. 50, no. 25 Suppl, p. 20-23.

Capuco, A. V., J. J. Smith, D. R. Waldo y C. E. Jr. Rexroad, 1995, Influence of prepubertal dietary regimen on mammary growth of Holstein heifers: *J.Dairy Sci.*, v. 78, p. 2709-2725.

Capuco, A. V. y S. Ellis, 2005, Bovine mammary progenitor cells: current concepts and future directions: *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.*, v. 10, no. 1, p. 5-15.

Capuco, A. V., S. Ellis, D. L. Wood, R. M. Akers y W. Garrett, 2002, Postnatal mammary ductal growth: three-dimensional imaging of cell proliferation, effects of estrogen treatment, and expression of steroid receptors in prepubertal calves: *Tissue Cell*, v. 34, no. 3, p. 143-154.

Cavestany, D. y col., 2009a, Effect of prepartum energetic supplementation on productive and reproductive characteristics, and metabolic and hormonal profiles in dairy cows under grazing conditions: *Reprod.Domest.Anim*, v. 44, no. 4, p. 663-671.

Cavestany, D., C. Vinales, M. A. Crowe, A. La Manna y A. Mendoza, 2009b, Effect of prepartum diet on postpartum ovarian activity in Holstein cows in a pasture-based dairy system: *Anim Reprod.Sci.*, v. 114, no. 1-3, p. 1-13.

Cerro, J. A., A. Grewal, T. L. Wood y J. E. Pintar, 1993, Tissue-specific expression of the insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) mRNAs in mouse and rat development: *Regul.Pept.*, v. 48, no. 1-2, p. 189-198.

Chagas, L. M., P. J. Gore, G. Graham, K. A. Macdonald y D. Blache, 2008, Effect of restricted feeding and monopropylene glycol postpartum on metabolic hormones and postpartum anestrus in grazing dairy heifers: *J.Dairy Sci.*, v. 91, no. 5, p. 1822-1833.

Charlier, J., E. Claerebout, L. Duchateau y J. Vercruyse, 2005, A survey to determine relationships between bulk tank milk antibodies against *Ostertagia ostertagi* and milk production parameters: *Vet.Parasitol.*, v. 129, no. 1-2, p. 67-75.

Charlier, J., L. Duchateau, E. Claerebout y J. Vercruyse, 2007, Predicting milk-production responses after an autumn treatment of pastured dairy herds with eprinomectin: *Vet.Parasitol.*, v. 143, no. 3-4, p. 322-328.

Charlier, J., J. Hoglund, G. Samson-Himmelstjerna, P. Dorny y J. Vercruyse, 2009, Gastrointestinal nematode infections in adult dairy cattle: impact on production, diagnosis and control: *Vet.Parasitol.*, v. 164, no. 1, p. 70-79.

Chilliard, Y., C. Delavaud y M. Bonnet, 2005, Leptin expression in ruminants: Nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism: *Domest.Anim Endocrinol.*, v. 29, no. 1, p. 3-22.

Chowen, J. A., L. M. Garcia-Segura, S. Gonzalez-Parra y J. Argente, 1996, Sex steroid effects on the development and functioning of the growth hormone axis: *Cell Mol.Neurobiol.*, v. 16, no. 3, p. 297-310.

Claerebout, E. y J. Vercruyse, 2000, The immune response and the evaluation of acquired immunity against gastrointestinal nematodes in cattle: a review: *Parasitology*, v. 120 Suppl, p. S25-S42.

Clayton, D. H., P. L. Lee, D. M. Tompkins y E. D. Brodie III, 1999, Reciprocal Natural Selection on Host-Parasite Phenotypes: *Am.Nat.*, v. 154, no. 3, p. 261-270.

Cliffe, L. J., N. E. Humphreys, T. E. Lane, C. S. Potten, C. Booth y R. K. Grencis, 2005, Accelerated intestinal epithelial cell turnover: a new mechanism of parasite expulsion: *Science*, v. 308, no. 5727, p. 1463-1465.

Coles, G. C., F. Jackson, W. E. Pomroy, R. K. Prichard, G. Samson-Himmelstjerna, A. Silvestre, M. A. Taylor y J. Vercruyse, 2006, The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance: *Vet.Parasitol.*, v. 136, no. 3-4, p. 167-185.

Connor, E. E., D. L. Wood, T. S. Sonstegard, A. F. da Mota, G. L. Bennett, J. L. Williams y A. V. Capuco, 2005, Chromosomal mapping and quantitative analysis of estrogen-related receptor alpha-1, estrogen receptors alpha and beta and progesterone receptor in the bovine mammary gland: *Journal of Endocrinology*, v. 185, no. 3, p. 593-603.

Collett-Solberg, P. F. y P. Cohen, 1996, The role of the insulin-like growth factor binding proteins and the IGFBP proteases in modulating IGF action: *Endocrinol.Metab Clin.North Am.*, v. 25, no. 3, p. 591-614.

Coop, R. L. y I. Kyriazakis, 1999, Nutrition-parasite interaction: *Vet.Parasitol.*, v. 84, p. 187-204.

Coop, R. L., A. R. Sykes y K. W. Angus, 1977, The effect of a daily intake of *Ostertagia circumcincta* larvae on body weight, food intake and concentration of serum constituents in sheep: *Res.Vet.Sci.*, v. 23, no. 1, p. 76-83.

Cunha, G. R., P. Young, Y. K. Hom, P. S. Cooke, J. A. Taylor y D. B. Lubahn, 1997, Elucidation of a role for stromal steroid hormone receptors in mammary gland growth and development using tissue recombinants: *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.*, v. 2, no. 4, p. 393-402.

Curtis, S. W., J. Clark, P. Myers y K. S. Korach, 1999, Disruption of estrogen signaling does not prevent progesterone action in the estrogen receptor alpha knockout mouse uterus: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 96, no. 7, p. 3646-3651.

Cusi, K. y R. Defronzo, 2000, Recombinant human insulin-like growth factor I treatment for 1 week improves metabolic control in type 2 diabetes by ameliorating hepatic and muscle insulin resistance: *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, v. 85, no. 9, p. 3077-3084.

Dallard, B. E., C. Baravalle, C. Andreotti, H. H. Ortega, V. Neder y L. F. Calvinho, 2011, Intramammary inoculation of Panax ginseng extract in cows at drying off enhances early mammary involution: *J.Dairy Res.*, v. 78, no. 1, p. 63-71.

Dallard, B. E., H. H. Ortega, I. A. Iguzquiza, N. R. Salvetti, O. A. Quaino y L. F. Calvinho, 2010, The effect of a single intramammary infusion of a biological response modifier in cows at drying off: *Vet.Res.Commun.*, v. 34, no. 6, p. 519-532.

Dallard, B. E., H. H. Ortega, J. A. Lorente y G. Romano, 2005, Immunolocalization and expression of insulin-like growth factor I (IGF-I) in the ovine mammary gland during mammogenesis, lactation and involution. *Small Ruminant Res.*, v. 58, p. 1-11.

Dallard, B. E., V. Ruffino, S. Heffel y L. F. Calvinho, 2007, Effect of a biological response modifier on expression of growth factors and cellular proliferation at drying off: *J.Dairy Sci.*, v. 90, no. 5, p. 2229-2240.

Dessauge, F., L. Finot, S. Wiart, J. M. Aubry y S. E. Ellis, 2009, Effects of ovariectomy in prepubertal goats: *J.Physiol Pharmacol.*, v. 60 Suppl 3, p. 127-133.

Diaz-Torga, G. S., M. E. Mejia, A. Gonzalez-Iglesias, N. Formia, D. Becu-Villalobos y I. M. Lacau-Mengido, 2001, Metabolic cues for puberty onset in free grazing Holstein heifers naturally infected with nematodes: *Theriogenology*, v. 56, no. 1, p. 111-122.

Dobos, R. C., Nandra K. S., Riley K., Fulkerson W. J., Lean I. J. y Kellawuay R. C. 2000. The effect of dietary protein level during the pre-pubertal period of grown of mammary gland development and subsequent milk production in Fresian heifers. *Livestock production science* 63, 235-243.

Dobson, R. J. y E. H. Barnes, 1995, Interaction between *Ostertagia circumcincta* and *Haemonchus contortus* infection in young lambs: *Int.J.Parasitol.*, v. 25, no. 4, p. 495-501.

Durnberger, H. y K. Kratochwil, 1980, Specificity of tissue interaction and origin of mesenchymal cells in the androgen response of the embryonic mammary gland: *Cell*, v. 19, no. 2, p. 465-471.

Elsasser, T. H., T. S. Rumsey y A. C. Hammond, 1989, Influence of diet on basal and growth hormone-stimulated plasma concentrations of IGF-I in beef cattle: *J.Anim.Sci.*, v. 67, no. 1, p. 128-141.

Eming, S. A., T. Krieg y J. M. Davidson, 2007, Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms: *J.Invest Dermatol.*, v. 127, no. 3, p. 514-525.

Entrocasso, C. M., 1988, Epidemiology and control of bovine ostertagiasis in South America: *Vet.Parasitol.*, v. 27, no. 1-2, p. 59-65.

Entrocasso, C. M. y C. Fiel, 1986, Caracterización de las enfermedades parasitarias en sistemas de producción de carne en la República Argentina.: Libro de Resúmenes de Disertaciones. 2° Simposio Internacional de Actualización Parasitaria. Buenos Aires., p. 11-16.

Entrocasso, C. M., J. J. Parkins, J. Armour, K. Bairden y P. N. McWilliam, 1986, Metabolism and growth in housed calves given a morantel sustained release bolus and exposed to natural trichostrongyle infection: *Res.Vet.Sci.*, v. 40, no. 1, p. 65-75.

Fainboin, L., y J. Geffner, 2011, Respuesta inmunitaria frente a las infestaciones parasitarias. en e Editodial médica panamericana ed., Introducción a la inmunología humana.: Buenos Aires, p. 425-436.

Fallon, P. G. y N. E. Mangan, 2007, Suppression of TH2-type allergic reactions by helminth infection: *Nat.Rev.Immunol.*, v. 7, no. 3, p. 220-230.

Farinati de Piccinni, Z., A. Galanterik, S. Malkischer de Marpes y S. Quiroga de Lasala, 1980, Normalización y control de calidad del radioinmunoanálisis., en C Libertun ed., Radioinmunoanálisis. Fundamentos y Aplicaciones.: Buenos Aires, Libreros López Editores, p. 79-107.

Farmer, C., D. Petitclerc, M. T. Sorensen, M. Vignola y J. Y. Dourmad, 2004, Impacts of dietary protein level and feed restriction during prepuberty on mammarygenesis in gilts: *J.Anim Sci.*, v. 82, no. 8, p. 2343-2351.

Fendrick, J. L., A. M. Raafat y S. Z. Haslam, 1998, Mammary gland growth and development from the postnatal period to postmenopause: ovarian steroid receptor ontogeny and regulation in the mouse: *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.*, v. 3, no. 1, p. 7-22.

Ferreira, DA., CA. Fiel, PE. Steffan y F. Gonzalez, 2002, Dinamica estacional y diaria en las pasturas de poblaciones de nematodos *Trichostrongylideos* de bovinos. *RIA.Revista de Investigaciones Agropecuarias.*, v. 31, p. 25-38.

Feuermann, Y., S. J. Mabeesh y A. Shamay, 2004, Leptin affects prolactin action on milk protein and fat synthesis in the bovine mammary gland: *J.Dairy Sci.*, v. 87, no. 9, p. 2941-2946.

Fiel, C. y col., 2001, Resistencia antihelmíntica en bovinos: causas, diagnóstico y profilaxis.: Vet.Argnt., v. 18, p. 21-33.

Fiel, C., C. Steffan y A. Almada, 1990, Epidemiology of Trichostrongyle infection in grazing cattle of the humid Pampa (Argentina) with special reference to *Ostertagia ostertagi*, en WHD Leaning and J Guerrero eds., Epidemiology of bovine parasites in the Americas: Lawrenceville, Veterinary Learning Systems Co., p. 15-24.

Fiel, C., P. Steffan y Ferreyra D., 2005, Manual para el diagnóstico de nematodos en bovinos. Bayer.División Sanidad Animal de Bayer Argentina S.A., p. 1-58.

Fiel, C. y P. E. Steffan, 1994, Guía de procedimientos para el diagnóstico de nematodos en bovinos.: Cuadernillo técnico editado por Lab.Hoechst Argentina S.A, p. 1-14.

Finkelman, F. D., T. Shea-Donohue, S. C. Morris, L. Gildea, R. Strait, K. B. Madden, L. Schopf y J. F. Urban, Jr., 2004, Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites: Immunol.Rev., v. 201, p. 139-155.

Fleming, J. y Z. Fabry, 2007, The hygiene hypothesis and multiple sclerosis: Ann.Neurol., v. 61, no. 2, p. 85-89.

Flint, D. J. y col., 2005, Insulin-like growth factor binding proteins initiate cell death and extracellular matrix remodeling in the mammary gland: Domest.Anim Endocrinol., v. 29, no. 2, p. 274-282.

Flint, D. J., M. Boutinaud, C. B. Whitelaw, G. J. Allan y A. F. Kolb, 2006, Prolactin inhibits cell loss and decreases matrix metalloproteinase expression in the involuting mouse mammary gland but fails to prevent cell loss in the mammary glands of mice expressing IGFBP-5 as a mammary transgene: J.Mol.Endocrinol., v. 36, no. 3, p. 435-448.

Fox, M. T., D. Gerrelli, S. R. Pitt, D. E. Jacobs, M. Gill y D. L. Gale, 1989, *Ostertagia ostertagi* infection in the calf: effects of a trickle challenge on appetite, digestibility, rate of passage of digesta and liveweight gain: Res.Vet.Sci., v. 47, no. 3, p. 294-298.

Frystyk, J., C. Skjaerbaek, B. Dinesen y H. Orskov, 1994, Free insulin-like growth factors (IGF-I and IGF-II) in human serum: FEBS Lett., v. 348, no. 2, p. 185-191.

Gartner, L., y J. L. Hiatt, 1995, Introducción a la histología y técnicas histológicas básicas, en Panamericana S.A. ed., Atlas de histología.: Buenos Aires, p. 5-25.

Gasbarre, L. C., E. A. Leighton y D. Bryant, 1996, Reliability of a single fecal egg per gram determination as a measure of individual and herd values for trichostrongyle nematodes of cattle: Am.J.Vet.Res., v. 57, no. 2, p. 168-171.

Gaston, K. J., 1996, What is biodiversity?, en Blackwell Science Ltd ed., Biodiversity: a biology of numbers and difference.: Oxford, U.K., p. 1-9.

Gatford, K. L. y col., 1996, Sexual dimorphism of circulating somatotropin, insulin-like growth factor I and II, insulin-like growth factor binding proteins, and insulin: relationships to growth rate and carcass characteristics in growing lambs: *J.Anim Sci.*, v. 74, no. 6, p. 1314-1325.

Ghizzoni, L. y G. Mastorakos, 2003, Interactions of leptin, GH, and cortisol in normal children: *Ann.N Y.Acad.Sci.*, v. 997, p. 56-63.

Gibb, M. J., C. A. Huckle y A. B. Forbes, 2005, Effects of sequential treatments with eprinomectin on performance and grazing behaviour in dairy cattle under daily-paddock stocking management: *Vet.Parasitol.*, v. 133, no. 1, p. 79-90.

Glauber, C. E., 2007, El manejo de la vaquillona de reposición en rodeo lechero, una introducción. *Veterinaria Argentina*, 24(234):274-281.: *Veterinaria Argentina*, v. 24, no. 234, p. 274-281.

Google earth, y Inav/Geosistemas SRL, 2012a, 25 de mayo. 35° 32'17''S 60° 23'18'' O. Elevación 56 m. Altura ojo 86 km.

Google earth, y Inav/Geosistemas SRL, 2012b, Escuela M. C. y M. L. Inchausti. 35° 36' 38'' S 60° 32'36'' O. Elevación 74 m. Altura ojo 2 km.

Grainger, J. R. y col., 2010, Helminth secretions induce de novo T cell Foxp3 expression and regulatory function through the TGF-beta pathway: *J.Exp.Med.*, v. 207, no. 11, p. 2331-2341.

Granger, A. L., W. E. Wyatt, W. M. Craig, D. L. Thompson, Jr. y F. G. Hembry, 1989, Effects of breed and wintering diet on growth, puberty and plasma concentrations of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in heifers: *Domest.Anim Endocrinol.*, v. 6, no. 3, p. 253-262.

Hadsell, D. L., N. M. Greenberg, J. M. Fligger, C. R. Baumrucker y J. M. Rosen, 1996, Targeted expression of des(1-3) human insulin-like growth factor I in transgenic mice influences mammary gland development and IGF-binding protein expression: *Endocrinology*, v. 137, no. 1, p. 321-330.

Hadsell, D. L. y S. G. Bonnette, 2000, IGF and insulin action in the mammary gland: lessons from transgenic and knockout models: *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.*, v. 5, no. 1, p. 19-30.

Haldane, J. B. S., 1949, Disease and evolution: *La Ricerca Scientifica*, v. 19, p. 68-76.

Harris, N. y W. C. Gause, 2011, To B or not to B: B cells and the Th2-type immune response to helminths: *Trends Immunol.*, v. 32, no. 2, p. 80-88.

Haslam, S. Z., 1989, The ontogeny of mouse mammary gland responsiveness to ovarian steroid hormones: *Endocrinology*, v. 125, no. 5, p. 2766-2772.

Hasnain, S. Z. y col., 2011, Muc5ac: a critical component mediating the rejection of enteric nematodes: *J.Exp.Med.*, v. 208, no. 5, p. 893-900.

- Hawkins, J. A., 1993, Economic benefits of parasite control in cattle: *Vet.Parasitol.*, v. 46, no. 1-4, p. 159-173.
- Hennighausen, L. y G. W. Robinson, 1998, Think globally, act locally: the making of a mouse mammary gland: *Genes Dev.*, v. 12, no. 4, p. 449-455.
- Henriksen, S. A. y H. Korsholm, 1983, A method for culture and recovery of gastrointestinal strongyle larvae: *Nord.Vet.Med.*, v. 35, no. 11, p. 429-430.
- Herbert, D. R. y col., 2009, Intestinal epithelial cell secretion of RELM-beta protects against gastrointestinal worm infection: *J.Exp.Med.*, v. 206, no. 13, p. 2947-2957.
- Hoeflich, A., P. Schmidt, J. Foll, O. Rottmann, M. M. Weber, H. J. Kolb, F. Pirchner y E. Wolf, 1998, Altered growth of mice divergently selected for body weight is associated with complex changes in the growth hormone/insulin-like growth factor system: *Growth Horm.IGF.Res.*, v. 8, no. 2, p. 113-123.
- Holmes, P. H., 1985, Pathogenesis of trichostrongylosis: *Vet.Parasitol.*, v. 18, p. 89-101.
- Hornick, J. L., C. Van Eenaeme, O. Gerard, I. Dufrasne y L. Istasse, 2000, Mechanisms of reduced and compensatory growth: *Domest.Anim Endocrinol.*, v. 19, no. 2, p. 121-132.
- Hosking, B. C., T. G. Watson y D. M. Leathwick, 1996, Multigenic resistance to oxfendazole by nematodes in cattle: *Vet.Rec.*, v. 138, no. 3, p. 67-68.
- Hovey, R. C., H. W. Davey, D. D. S. Mackenzie y T. B. McFadden, 1998, Ontogeny and epithelial-stromal interactions regulate IGF expression in the ovine mammary gland: *Mol.Cell.Endocrinol.*, v. 136, no. 2, p. 139-144.
- Hovey, R. C., T. B. McFadden y R. M. Akers, 1999, Regulation of mammary gland growth and morphogenesis by the mammary fat pad: a species comparison: *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.*, v. 4, no. 1, p. 53-68.
- Hovey, R. C. y J. F. Trott, 2004, Morphogenesis of mammary gland development: *Adv.Exp.Med.Biol.*, v. 554, p. 219-228.
- Hovey, R. C., J. F. Trott y B. K. Vonderhaar, 2002, Establishing a framework for the functional mammary gland: from endocrinology to morphology: *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.*, v. 7, no. 1, p. 17-38.
- Imagawa, W., G. K. Bandyopadhyay y S. Nandi, 1990, Regulation of mammary epithelial cell growth in mice and rats: *Endocr.Rev.*, v. 11, no. 4, p. 494-523.
- Johnson, T. L., B. A. Fujimoto, R. Jimenez-Flores y D. G. Peterson, 2010, Growth hormone alters lipid composition and increases the abundance of casein and lactalbumin mRNA in the MAC-T cell line: *J.Dairy Res*, v. 77, no. 2, p. 199-204.
- Jones, J. I. y D. R. Clemmons, 1995, Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions: *Endocr.Rev.*, v. 16, no. 1, p. 3-34.

Kapur, S., H. Tamada, S. K. Dey y G. K. Andrews, 1992, Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and its receptor in the peri-implantation mouse uterus, and cell-specific regulation of IGF-I gene expression by estradiol and progesterone: *Biol.Reprod.*, v. 46, no. 2, p. 208-219.

Kenyon, F. y col., 2009, The role of targeted selective treatments in the development of refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants: *Vet.Parasitol.*, v. 164, no. 1, p. 3-11.

Kleinberg, D. L., T. L. Wood, P. A. Furth y A. V. Lee, 2009, Growth hormone and insulin-like growth factor-I in the transition from normal mammary development to preneoplastic mammary lesions: *Endocr.Rev.*, v. 30, no. 1, p. 51-74.

Kleinberg, D. L., M. Feldman y W. Ruan, 2000, IGF-I: an essential factor in terminal end bud formation and ductal morphogenesis: *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.*, v. 5, no. 1, p. 7-17.

Klotz, D. M., S. C. Hewitt, P. Ciana, M. Raviscioni, J. K. Lindzey, J. Foley, A. Maggi, R. P. DiAugustine y K. S. Korach, 2002, Requirement of estrogen receptor-alpha in insulin-like growth factor-1 (IGF-1)-induced uterine responses and in vivo evidence for IGF-1/estrogen receptor cross-talk: *J.Biol.Chem.*, v. 277, no. 10, p. 8531-8537.

Klotz, D. M., S. C. Hewitt, K. S. Korach y R. P. DiAugustine, 2000, Activation of a uterine insulin-like growth factor I signaling pathway by clinical and environmental estrogens: requirement of estrogen receptor-alpha: *Endocrinology*, v. 141, no. 9, p. 3430-3439.

Korach, K. S. y col., 1996, Estrogen receptor gene disruption: molecular characterization and experimental and clinical phenotypes: *Recent Prog.Horm.Res.*, v. 51, p. 159-186.

Lacau-Mengido, I. M., M. E. Mejía, G. S. Díaz-Torga, A. González-Iglesias, N. Formía, C. Libertun y D. Becú-Villalobos, 2000, Endocrine studies in ivermectin-treated heifers from birth to puberty: *J.Anim.Sci.*, v. 78, p. 817-824.

Lammers, B. P., A. J. Heinrichs y R. S. Kensinger, 1999, The effects of accelerated growth rates and estrogen implants in prepubertal Holstein heifers on estimates of mammary development and subsequent reproduction and milk production: *J.Dairy Sci.*, v. 82, no. 8, p. 1753-1764.

Larson, R. L., L. R. Corah, M. F. Spire y R. C. Cochran, 1995, Effect of treatment with ivermectin on reproductive performance of yearling beef heifers: *Theriogenology*, v. 44, p. 189-197.

Levine, N. D., 1963, Weather, climate and the bionomics of ruminant nematode larvae.: *Ad.Vet.Sci.*, v. 8, p. 215-261.

Li, R. W., M. J. Meyer, C. P. Van Tassell, T. S. Sonstegard, E. E. Connor, M. E. Van Amburgh, Y. R. Boisclair y A. V. Capuco, 2006, Identification of estrogen-responsive genes in the parenchyma and fat pad of the bovine mammary gland by microarray analysis: *Physiol Genomics*, v. 27, no. 1, p. 42-53.

Licoff, N, Diab, S, Perri, A F, Mejia, M E, Formía, N, Becu-Villalobos, Dy Lacau-Mengido, I M. Mammary biopsies in Prepubertal Heifers. Histological studies of the developmental gland. Effect of anthelmintic treatment. *Biocell* 33[1], A40. 2009.

Ref Type: Abstract

Lydon, J. P., F. J. DeMayo, C. R. Funk, S. K. Mani, A. R. Hughes, C. A. Montgomery, Jr., G. Shyamala, O. M. Conneely y B. W. O'Malley, 1995, Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities: *Genes Dev.*, v. 9, no. 18, p. 2266-2278.

Lydon, J. P., L. Sivaraman y O. M. Conneely, 2000, A reappraisal of progesterone action in the mammary gland: *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.*, v. 5, no. 3, p. 325-338.

Martinet, J., y L. M. Houdebine, 1993, Glánde mammaire, mammodenogénese facteurs de croissance lactogénese. en HLMe Martinet J. ed., *Biologie de la lactacion.*: Paris, p. 3-30.

Masso-Welch, P. A., K. M. Darcy, N. C. Stangle-Castor y M. M. Ip, 2000, A developmental atlas of rat mammary gland histology: *J Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.*, v. 5, no. 2, p. 165-185.

McCoy, K. D. y col., 2008, Polyclonal and specific antibodies mediate protective immunity against enteric helminth infection: *Cell Host.Microbe*, v. 4, no. 4, p. 362-373.

Mejía, M. E., B. M. Fernández-Igartúa, E. E. Schmidt y J. Cabaret, 2003, Multispecies and multiple anthelmintic resistance on cattle nematodes in a farm in Argentina: the beginning of high resistance?: *Vet.Res.*, v. 34, p. 461-467.

Mejia, M. E., A. Gonzalez-Iglesias, G. Diaz-Torga, P. Villafañe, N. Formía, C. Libertun, D. Becu-Villalobos y I. M. Lacau-Mengido, 1999, Effect of continuous ivermectin treatment from birth to puberty on growth and reproduction in dairy heifers.: *J.Anim.Sci.*, v. 77, p. 1329-1334.

Mejía, M. E., A. González-Iglesias, G. S. Díaz-Torga, P. Villafañe, N. Formía, C. Libertun, D. Becú-Villalobos y I. M. Lacau-Mengido, 1999, Effects of continuous ivermectin treatment from birth to puberty on growth and reproduction in dairy heifers: *J.Anim.Sci.*, v. 77, no. 6, p. 1329-1334.

Mejia, M. E., A. F. Perri, M. M. Miglierina, N. Formia, D. Becu-Villalobos y I. M. Lacau-Mengido, 2009, Effect of anthelmintics on reproductive performance and first-lactation culling rate in Holstein heifers: *Vet.Rec.*, v. 165, no. 25, p. 743-746.

Mertz, K. J., M. B. Hildreth y W. B. Epperson, 2005, Assessment of the effect of gastrointestinal nematode infestation on weight gain in grazing beef cattle: *J.Am.Vet.Med.Assoc.*, v. 226, no. 5, p. 779-783.

Meyer, M. J., A. V. Capuco, Y. R. Boisclair y M. E. Van Amburgh, 2006, Estrogen-dependent responses of the mammary fat pad in prepubertal dairy heifers: *J.Endocrinol.*, v. 190, no. 3, p. 819-827.

Meyer, M. J., R. P. Rhoads, A. V. Capuco, E. E. Connor, A. Hummel, Y. R. Boisclair y M. E. Van Amburgh, 2007, Ontogenic and nutritional regulation of steroid receptor and IGF-I transcript abundance in the prepubertal heifer mammary gland: *J.Endocrinol.*, v. 195, no. 1, p. 59-66.

Mohrs, M., K. Shinkai, K. Mohrs y R. M. Locksley, 2001, Analysis of type 2 immunity in vivo with a bicistronic IL-4 reporter: *Immunity.*, v. 15, no. 2, p. 303-311.

Mueller, S. O., J. A. Clark, P. H. Myers y K. S. Korach, 2002, Mammary gland development in adult mice requires epithelial and stromal estrogen receptor alpha: *Endocrinol*, v. 143, no. 6, p. 2357-2365.

Mukhina, S., D. Liu, K. Guo, M. Raccurt, S. Borges-Bendris, H. C. Mertani y P. E. Lobie, 2006, Autocrine growth hormone prevents lactogenic differentiation of mouse mammary epithelial cells: *Endocrinology*, v. 147, no. 4, p. 1819-1829.

Murphy, L. C., H. Dotzlaw, M. S. Wong, T. Miller, B. Mrockowski, Y. Gong y L. J. Murphy, 1990, Epidermal growth factor: receptor and ligand expression in human breast cancer: *Semin.Cancer Biol.*, v. 1, no. 5, p. 305-315.

Nodtvedt, A., I. Dohoo, J. Sanchez, G. Conboy, L. DesCoteaux y G. Keefe, 2002, Increase in milk yield following eprinomectin treatment at calving in pastured dairy cattle: *Vet.Parasitol.*, v. 105, no. 3, p. 191-206.

Oakes, S. R., R. L. Rogers, M. J. Naylor y C. J. Ormandy, 2008, Prolactin regulation of mammary gland development: *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.*, v. 13, no. 1, p. 13-28.

Ortega, H. H., N. R. Salvetti, P. Amable, B. E. Dallard, C. Baravalle, C. G. Barbeito y E. J. Gimeno, 2007, Intraovarian localization of growth factors in induced cystic ovaries in rats: *Anat.Histol.Embryol.*, v. 36, no. 2, p. 94-102.

Ortíz-Avila, T., 2008, Caracterización de sistemas de manejo de recursos naturales., en Astier M., Masera O., and Galván-Miyoshi Y. eds., Evaluación de sustentabilidad.: Valencia, España, SIAE; CIGA; ECOSUR; CIEco; UNAM; GIRA; Mundiprensa; Fundación Instituto de Agricultura Ecológica y Sustentable, p. 59-71.

Ozkan, E. E., 2011, Plasma and tissue insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) as a prognostic marker for prostate cancer and anti-IGF-IR agents as novel therapeutic strategy for refractory cases: a review: *Mol.Cell Endocrinol.*, v. 344, no. 1-2, p. 1-24.

Pedernera, M., S. C. Garcia, A. Horagadoga, I. Barchia y W. J. Fulkerson, 2008, Energy balance and reproduction on dairy cows fed to achieve low or high milk production on a pasture-based system: *J.Dairy Sci.*, v. 91, no. 10, p. 3896-3907.

Pedersen, A. B. y A. Fenton, 2007, Emphasizing the ecology in parasite community ecology: *Trends Ecol.Evol.*, v. 22, no. 3, p. 133-139.

Petitlerc, D., L. T. Chapin y H. A. Tucker, 1984, Carcass composition and mammary development responses to photoperiod and plane of nutrition in Holstein heifers: J.Anim Sci., v. 58, no. 4, p. 913-919.

Plath-Gabler, A., C. Gabler, F. Sinowatz, B. Berisha y D. Schams, 2001, The expression of the IGF family and GH receptor in the bovine mammary gland: J.Endocrinol., v. 168, no. 1, p. 39-48.

Prickett, M. D., A. M. Latimer, R. H. McCusker, G. J. Hausman y A. K. Prestwood, 1992, Alterations of serum insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins (IGFBPs) in swine infected with the protozoan parasite *Sarcocystis miescheriana*: Domest.Anim Endocrinol., v. 9, no. 4, p. 285-296.

Purup, S., K. Sejrsen, J. Foldager y R. M. Akers, 1993, Effect of exogenous bovine growth hormone and ovariectomy on prepubertal mammary growth, serum hormones and acute in-vitro proliferative response of mammary explants from Holstein heifers: J.Endocrinol., v. 139, p. 19-26.

Purvis, H. T. y J. C. Whittier, 1996, Effects of ionophore feeding and anthelmintic administration on age and weight at puberty in spring-born beef heifers: J.Anim.Sci., v. 74, no. 4, p. 736-744.

Quiroz, R. H., 1990, Nematelmintos y acantocéfalos. en ed Limusa ed., Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domesticos. Mexico D. F., p. 367-645.

Reinecke, R. K., C. M. Bruckner y I. L. De Villiers, 1980, Studies on *Haemonchus contortus*. III. Titration of *Trichostrongylus axei* and expulsion of *H. contortus*: Onderstepoort J.Vet.Res., v. 47, no. 1, p. 35-44.

Reinecke, R. K., I. L. De Villiers y G. Joubert, 1982, The effect of predosing calves with *Trichostrongylus axei* on subsequent challenge with *Haemonchus placei*: Onderstepoort J.Vet.Res., v. 49, no. 3, p. 159-161.

Renaville, R., M. Hammadi y D. Portetelle, 2002, Role of the somatotropic axis in the mammalian metabolism: Domest.Anim Endocrinol., v. 23, no. 1-2, p. 351-360.

Richards, R. G., D. M. Klotz, M. P. Walker y R. P. Diaugustine, 2004, Mammary gland branching morphogenesis is diminished in mice with a deficiency of insulin-like growth factor-I (IGF-I), but not in mice with a liver-specific deletion of IGF-I: Endocrinology, v. 145, no. 7, p. 3106-3110.

Richert, M. M. y T. L. Wood, 1999, The insulin-like growth factors (IGF) and IGF type I receptor during postnatal growth of the murine mammary gland: sites of messenger ribonucleic acid expression and potential functions: Endocrinology, v. 140, no. 1, p. 454-461.

Rosenfeld, R. G., H. Pham, P. Cohen, P. Fielder, S. E. Gargosky, H. Muller, L. Nonoshita y Y. Oh, 1994, Insulin-like growth factor binding proteins and their regulation: Acta Paediatr.Suppl, v. 399, p. 154-158.

Ruan, W., V. Catanese, R. Wiczorek, M. Feldman y D. L. Kleinberg, 1995, Estradiol enhances the stimulatory effect of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on mammary development and growth hormone-induced IGF-I messenger ribonucleic acid: *Endocrinology*, v. 136, no. 3, p. 1296-1302.

Ruan, W. y D. L. Kleinberg, 1999, Insulin-like growth factor I is essential for terminal end bud formation and ductal morphogenesis during mammary development: *Endocrinol*, v. 140, no. 11, p. 5075-5081.

Ruan, W., M. E. Monaco y D. L. Kleinberg, 2005, Progesterone stimulates mammary gland ductal morphogenesis by synergizing with and enhancing insulin-like growth factor-I action: *Endocrinol*, v. 146, no. 3, p. 1170-1178.

Ruan, W., C. B. Newman y D. L. Kleinberg, 1992, Intact and amino-terminally shortened forms of insulin-like growth factor I induce mammary gland differentiation and development: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 89, no. 22, p. 10872-10876.

Ryan, W. G., R. J. Crawford, Jr., S. J. Gross y D. H. Wallace, 1997, Assessment of parasite control and weight gain after use of an ivermectin sustained-release bolus in calves: *J.Am.Vet.Med.Assoc.*, v. 211, no. 6, p. 754-756.

Saenz, S. A., Taylor B.C. y Artis D., 2008, Welcome to the neighborhood: epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites.: *Immunol.Rev.*, v. 226, p. 172-190.

Sanchez, J. y I. Dohoo, 2002, A bulk tank milk survey of *Ostertagia ostertagi* antibodies in dairy herds in Prince Edward Island and their relationship with herd management factors and milk yield: *Can.Vet.J.*, v. 43, no. 6, p. 454-459.

Sans, F. X., 2007, La diversidad de los agroecosistemas.: *Ecosistemas*, v. 16, p. 44-49.

Satoguina, J. S., E. Weyand, J. Larbi y A. Hoerauf, 2005, T regulatory-1 cells induce IgG4 production by B cells: role of IL-10: *J.Immunol.*, v. 174, no. 8, p. 4718-4726.

Savage, M. O., S. Scommegna, P. V. Carroll, J. T. Ho, J. P. Monson, G. M. Besser y A. B. Grossman, 2002, Growth in disorders of adrenal hyperfunction: *Horm.Res.*, v. 58 Suppl 1, p. 39-43.

Schallig, H. D., 2000, Immunological responses of sheep to *Haemonchus contortus*: *Parasitology*, v. 120 Suppl, p. S63-S72.

Schams, D., S. Kohlenberg, W. Amselgruber, B. Berisha, M. W. Pfaffl y F. Sinowatz, 2003, Expression and localisation of oestrogen and progesterone receptors in the bovine mammary gland during development, function and involution: *Journal of Endocrinology*, v. 177, no. 2, p. 305-317.

Sejrsen, K., 1994, Relationships between nutrition, puberty and mammary development in cattle: *Proc.Nutr.Soc.*, v. 53, no. 1, p. 103-111.

Sejrsen, K., S. Purup, M. Vestergaard y J. Foldager, 2000, High body weight gain and reduced bovine mammary growth: physiological implications for milk yield potential: *Domest.Anim.Endocrinol.*, v. 19, p. 93-104.

Servicio Meteorológico Nacional (SMN), 2007a, Diciembre 2007: Departamento Agrometeorología: .Secretaría de planeamiento.Ministerio de Defensa.República Argentina., v. 12, p. 1-26.

Servicio Meteorológico Nacional (SMN), 2007b, Septiembre 2007: Departamento Agrometeorología: Servicio Meteorológico Nacional (SMN).Secretaría de planeamiento.Ministerio de Defensa., v. 9, p. 1-31.

Servicio Meteorológico Nacional (SMN), 2008a, Enero 2008: Departamento Agrometeorología: Secretaría de planeamiento.Ministerio de Defensa.República Argentina., v. 1, p. 1-30.

Servicio Meteorológico Nacional (SMN), 2008b, Febrero 2008. Departamento Agrometeorología: .Secretaría de planeamiento.Ministerio de Defensa.República Argentina., v. 2, p. 1-25.

Shi, H. Y., J. P. Lydon y M. Zhang, 2004, Hormonal defect in maspin heterozygous mice reveals a role of progesterone in pubertal ductal development: *Mol.Endocrinol.*, v. 18, no. 9, p. 2196-2207.

Silberstein, G. B., 2001, Postnatal mammary gland morphogenesis: *Microsc.Res.Tech.*, v. 52, no. 2, p. 155-162.

Silberstein, G. B., K. Van Horn, G. Shyamala y C. W. Daniel, 1994, Essential role of endogenous estrogen in directly stimulating mammary growth demonstrated by implants containing pure antiestrogens: *Endocrinol*, v. 134, no. 1, p. 84-90.

Simpson, H. V., 2000, Pathophysiology of abomasal parasitism: is the host or parasite responsible?: *Vet.J.*, v. 160, no. 3, p. 177-191.

Sithole, F., I. Dohoo, K. Leslie, L. DesCoteaux, S. Godden, J. Campbell, H. Stryhn y J. Sanchez, 2005, Effect of eprinomectin treatment at calving on milk production in dairy herds with limited outdoor exposure: *J.Dairy Sci.*, v. 88, no. 3, p. 929-937.

Sordillo, L. M., G. A. Contreras y S. L. Aitken, 2009, Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows: *Anim Health Res.Rev.*, v. 10, no. 1, p. 53-63.

Sorensen, M. T., J. V. Norgaard, P. K. Theil, M. Vestergaard y K. Sejrsen, 2006, Cell turnover and activity in mammary tissue during lactation and the dry period in dairy cows: *J.Dairy Sci.*, v. 89, no. 12, p. 4632-4639.

Steel, J. W., W. O. ones y L. E. A. Symons, 1982, Effects of a concurrent infection of *Trichostrongylus colubriformis* on the productivity and physiological and metabolic response of lambs infected with *Oatertagia circumscincta*.: *Aust.J.Agric.Res.*, v. 33, p. 131-140.

Steffan, P. O. y C. Fiel, 1986, Bioecología de los nematodos gastrointestinales. II supervalencia y variación estacional de las larvas en las pasturas; III la materia fecal como reservorio de larvas.: *Prod.Anim.*, v. 1, p. 139-140.

Stromberg, B. E. y L. C. Gasbarre, 2006, Gastrointestinal nematode control programs with an emphasis on cattle: *Vet.Clin.North Am.Food Anim Pract.*, v. 22, no. 3, p. 543-565.

Suarez, V. H., 1990a, Inhibition patterns and seasonal availability of nematodes for beef cattle grazing on Argentina's Western Pampas: *Int.J.Parasitol.*, v. 20, p. 1031.

Suarez, V. H., 1990b, Variación estacional de las poblaciones de helmintos parásitos de bovinos en sistemas de invernada de la región semiárida y subhúmeda pampeana. *Rev.Med.Vet.*, v. 71, p. 6-19.

Suarez, V. H., 1994, Los parásitos internos del bovino en la region semiarida y subhúmeda pampeana: En Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, v. 47, p. 5-27.

Suarez, V. H., D. O. Bedotti, S. Larrea, M. R. Buseti y C. A. Garriz, 1991, Effect of an integrated control programme with ivermectin on growth, carcasse composition and nematode infection of beef cattle in Argentina's western pampas.: *Research in Veterinary Science*, v. 50, no. 2, p. 195-199.

Suarez, V. H. y R. L. Lorenzo, 2000, Ecology of the free living stages of cattle nematodes during summer contamination in Argentina Western Pampas: *Parasite*, v. 7, no. 4, p. 255-261.

Tapanainen, P. J., P. Bang, K. Wilson, T. G. Unterman, H. J. Vreman y R. G. Rosenfeld, 1994, Maternal hypoxia as a model for intrauterine growth retardation: effects on insulin-like growth factors and their binding proteins: *Pediatr.Res.*, v. 36, no. 2, p. 152-158.

Tolleson, D. R., G. E. Carstens, T. H. Welsh, Jr., P. D. Teel, O. F. Strey, M. T. Longnecker, S. D. Prince y K. K. Banik, 2012, Plane of nutrition by tick burden interaction in cattle: Effect on growth and metabolism: *J.Anim Sci.*

Tolleson, D. R., P. D. Teel, J. W. Stuth, O. F. Strey, T. H. Welsh, Jr., G. E. Carstens, M. T. Longnecker, K. K. Banik y S. D. Prince, 2010, Effects of a lone star tick (*Amblyomma americanum*) burden on performance and metabolic indicators in growing beef steers: *Vet.Parasitol.*, v. 173, no. 1-2, p. 99-106.

Topper, Y. J. y C. S. Freeman, 1980, Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland: *Physiol Rev.*, v. 60, no. 4, p. 1049-1106.

Torres-Acosta, J. F., D. E. Jacobs, A. Aguilar-Caballero, C. Sandoval-Castro, M. May-Martinez y L. A. Cob-Galera, 2004, The effect of supplementary feeding on the resilience and resistance of browsing Criollo kids against natural gastrointestinal nematode infections during the rainy season in tropical Mexico: *Vet.Parasitol.*, v. 124, no. 3-4, p. 217-238.

Tucker, H. A., 1981, Physiological control of mammary growth, lactogenesis, and lactation: *J.Dairy Sci.*, v. 64, no. 6, p. 1403-1421.

Turner, C. W., H.Yamamoto y L.Ruppert., 1956, The experimental induction of growth of the cow's udder and the initiation of milk secretion.: *J.Dairy Sci.*, v. 39, p. 1717-1723.

Ullrich, A. y col., 1985, Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes: *Nature*, v. 313, no. 6005, p. 756-761.

Ullrich, A. y col., 1986, Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity: *EMBO J.*, v. 5, no. 10, p. 2503-2512.

Walden, P. D., W. Ruan, M. Feldman y D. L. Kleinberg, 1998, Evidence that the mammary fat pad mediates the action of growth hormone in mammary gland development: *Endocrinol.*, v. 139, no. 2, p. 659-662.

Waters, M. J., H. N. Hoang, D. P. Fairlie, R. A. Pelekanos y R. J. Brown, 2006, New insights into growth hormone action: *J.Mol.Endocrinol.*, v. 36, no. 1, p. 1-7.

Weber, M. S., S. Purup, M. Vestergaard, R. M. Akers y K. Sejrsen, 2000, Regulation of local synthesis of insulin-like growth factor-I and binding proteins in mammary tissue: *J.Dairy Sci.*, v. 83, no. 1, p. 30-37.

Whitlock, B. K., J. A. Daniel, R. R. Wilborn, T. H. Elsasser, J. A. Carroll y J. L. Sartin, 2008, Comparative aspects of the endotoxin- and cytokine-induced endocrine cascade influencing neuroendocrine control of growth and reproduction in farm animals: *Reprod.Domest.Anim*, v. 43 Suppl 2, p. 317-323.

Widmaier, E. P., 1992, Metabolic feedback in mammalian endocrine system: *Horm.Metab.Res.*, v. 24, p. 147-153.

Williams, J. C., 1983, Internal parasites of cattle: Cuadernillo de divulgación editado por American Hoechst Corporation..

Williams, P., C. Humphries, D. Vane-Wright y K. Gaston, 1996, Value in biodiversity, ecological services and consensus: *Trends Ecol.Evol.*, v. 11, no. 9, p. 385.

Wilson, E. O., 1988, The current state of biological diversity, en EO Wilson ed., *Biodiversity*: Washington, DC, National Academy of Sciences/Smithsonian Institution., p. 1-497.

Wilson, M. S., M. D. Taylor, A. Balic, C. A. Finney, J. R. Lamb y R. M. Maizels, 2005, Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory T cells: *J.Exp.Med.*, v. 202, no. 9, p. 1199-1212.

Wolf, E., P. M. Jehle, M. M. Weber, H. Sauerwein, A. Daxenberger, B. H. Breier, U. Besenfelder, L. Frenyo y G. Brem, 1997, Human insulin-like growth factor I (IGF-I) produced in the mammary glands of transgenic rabbits: yield, receptor binding,

mitogenic activity, and effects on IGF-binding proteins: *Endocrinology*, v. 138, no. 1, p. 307-313.

Woods, A. y C. R. Ellis , 1994, *Laboratory Histopathology: A Complete Reference*. London.

Woodward, T. L., J. W. Xie y S. Z. Haslam, 1998, The role of mammary stroma in modulating the proliferative response to ovarian hormones in the normal mammary gland: *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.*, v. 3, no. 2, p. 117-131.

Yakar, S., H. Kim, H. Zhao, Y. Toyoshima, P. Pennisi, O. Gavrilova y D. LeRoith, 2005, The growth hormone-insulin like growth factor axis revisited: lessons from IGF-1 and IGF-1 receptor gene targeting: *Pediatr.Nephrol.*, v. 20, no. 3, p. 251-254.

Yamamoto, H. y C. W. Tuner, 1956, Experimental mammary gland growth in rabbits by estrogen and progesterone: *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, v. 92, no. 1, p. 130-132.

Yambayamba, E. S., M. A. Price y G. R. Foxcroft, 1996, Hormonal status, metabolic changes, and resting metabolic rate in beef heifers undergoing compensatory growth: *J.Anim Sci.*, v. 74, no. 1, p. 57-69.

Zajac, A. M., J. W. Hansen, W. D. Whittier y D. E. Eversole, 1991, The effect of parasite control on fertility in beef heifers: *Vet.Parasitol.*, v. 40, no. 3-4, p. 281-291.

Zhou, Y., R. M. Akers y H. Jiang, 2008, Growth hormone can induce expression of four major milk protein genes in transfected MAC-T cells: *J.Dairy Sci.*, v. 91, no. 1, p. 100-108.