

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



Efecto de la mastitis subclínica y los diferentes niveles de células somáticas sobre algunos parámetros reproductivos en vacas Holstein.

POR:

RAÚL PINEDA MEJÍA

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAH., MÉXICO

JUNIO DEL 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

Efecto de la mastitis subclínica y los diferentes niveles de células somáticas sobre algunos parámetros reproductivos en vacas Holstein

POR:

RAÚL PINEDA MEJÍA

TESIS

QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

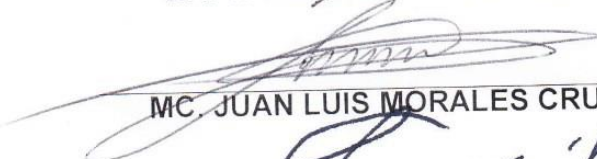
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADO POR

PRESIDENTE:


DR. CARLOS LEYVA ORASMA

VOCAL:


MC. JUAN LUIS MORALES CRUZ

VOCAL:



DR. FRANCISCO GERARDO VELIZ DERAS

VOCAL SUPLENTE:


MVZ. EPAB. CARLOS RAMÍREZ FERNÁNDEZ


DR. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL


Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

TORREÓN, COAH., MÉXICO

JUNIO DEL 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

Efecto de la mastitis subclínica y los diferentes niveles de células somáticas sobre algunos parámetros reproductivos en vacas Holstein

POR:

RAÚL PINEDA MEJÍA

TESIS

QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL COMITÉ DE ASESORÍA
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADO POR

ASESOR PRINCIPAL:


DR. CARLOS LEYVA ORASMA

ASESOR:


MC. JUAN LUIS MORALES CRUZ

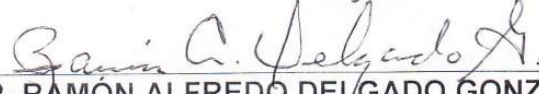
ASESOR:


DR. FRANCISCO GERARDO VÉLIZ DERAS

ASESOR:



MVZ. EPAB. CARLOS RAMÍREZ FERNÁNDEZ

ASESOR:


DR. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ


DR. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL


Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

AGRADECIMIENTOS

A **Cristina Guerrero Millán** quien fue valiente al tomar la decisión de vivir y estudiar a mi lado su carrera universitaria y durante nuestros estudios, darme el mayor regalo de ser padre de nuestros bebés Scarlett y Evans quienes cargó en su vientre en los últimos semestres de estudio. Gracias por esta maravillosa familia.

Agradezco infinitamente a mis padres **Nicolás Ernesto Pineda Cárdenas y Catalina Mejía García** que a pesar de la distancia apoyaron en mi carrera y en las decisiones que tomé para lograr satisfactoriamente mis metas. Por sus sabios consejos e incondicionales esfuerzos.

A mis hermanos, por su ayuda, a mis amigos especialmente a **Jazmín Cristela** por su gran confianza, cariño y amistad. Juan Diego, Shara, Andrés Treviño, y demás, gracias a ellos por cruzarse en mi vida. A mis tíos, el Sr. Vicente Pineda y Sra. Minerva Elorza quienes compartieron su calidez y su hogar conmigo y mi esposa.

Al **Dr. Ramón Alfredo Delgado González**, profesor en la universidad quien es un pilar angular en mi formación profesional por sus pláticas llenas de consejos y conocimiento.

Al **M.C. Juan Luis Morales Cruz** que confió y compartió parte de su proyecto de doctorado e hizo posible este trabajo de tesis. Excelente trabajo en equipo.

A mis asesores de tesis **Dr. Carlos Leyva Orasma, MVZ. EPAB. Carlos Ramírez Fernández, Dr. Francisco Gerardo Véliz Deras**, por su tiempo valioso dedicado a la revisión del presente trabajo.

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna** y a todos los maestros y compañeros que compartieron su tiempo y conocimiento en favor de mi formación profesional y desarrollo personal, me llevo lo mejor y me quedo con los valores fomentados.

A todos ellos muchas gracias y bendiciones.

DEDICATORIA

Dedicado a la mujer que eligió formar su familia conmigo Cristina Guerrero Millán y a la luz de todas mis mañanas mis pequeños hijos Scarlett Pineda Guerrero y Evans Pineda Guerrero.

ABREVIATURAS

CCS. Conteo de Células Somáticas.

CD4. Cluster of Differentiation 4

CD8. Cluster of Differentiation 8

MHC. Complejo Mayor de Histocompatibilidad

CYP11A1, CYP17A1, CYP19A1. Genes de la enzima Cytochrome P450.

DA. Días Abiertos.

DPS. Días a Primer Servicio.

E2. 17 β -estradiol.

FSH. Hormona Folículo Estimulante.

GCSF. Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos.

GDF-9. Factor de Crecimiento y Diferenciación 9.

GnRH. Factor de Liberación de Gonadotropinas.

IGF-1. Factor de Crecimiento similar a Insulina 1.

IA. Inseminación Artificial.

IL. Interleucina.

IFN γ . Interferon gamma.

LH. Hormona Luteinizante.

LPS. Lipopolisacáridos.

LTA. Ácido Lipoteicoico.

NK. Natural Killer.

NO. Óxido Nítrico.

PAMPs. Patrones Moleculares Asociados a Patógenos Específicos.

PGF_{2a}. Prostaglandina F_{2a}.

PGE₂. Prostaglandina E₂.

PGFM. 13,14-dihidro 15-ceto Prostaglandina F₂ alfa.

PMN. Poli-Morfo-Nucleares.

SC. Servicios por Concepción.

TCPS. Tasa de Concepción a Primer Servicio.

TCSS. Tasa de Concepción a Segundo Servicio.

TLR. Receptores Toll-like.

TNF_a. Factor de Necrosis Tumoral alfa.

RESUMEN

Efecto de la mastitis subclínica y los diferentes niveles de células somáticas sobre algunos parámetros reproductivos en vacas Holstein Friesian.

POR:

Raúl Pineda Mejía

Medicina veterinaria y zootecnia

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

ASESOR:

Dr. Carlos Leyva Orasma

El objetivo de estudio fue determinar el efecto de mastitis subclínica y conteo de células somáticas (CCS) en el desempeño reproductivo de vacas Holstein. En el primer estudio se agruparon 884 vacas de acuerdo a estado de salud del periodo parto a concepción en 3 grupos: sanas (SA) (n=584), enfermas de mastitis subclínica (MS) (n=105) y mastitis clínica (MC) (n=195). En el segundo estudio las vacas se agruparon de acuerdo a CCS que tuvieron del parto a concepción: <200,000 CCS/ml (n=719), entre 201,000-400,000 CCS/ml (n=72) y >400,000 CCS/ml (n=93). El CCS se midió mensual con la prueba fossomatic. Las variables: días a primer servicio (DPS), días abiertos (DA), servicios por concepción (SC), tasa de concepción a primer servicio (TCPS) y segundo servicio (TCSS) se midieron a cada grupo en ambos estudios. El resultado del primer estudio reveló diferencia significativa en DPS ($p<0.05$) en vacas con MC comparado con SA y MS. No hubo diferencia ($p>0.05$) entre vacas con MS y SA para DPS. La TCPS fue 14.6% y 15.77% menor en MS y MC respectivamente, comparado con SA ($p<0.05$). Cuando se midió por CCS, vacas <200,000 tuvieron TCPS de 23,64% en comparación con 11,11% y 6,45% en grupos 201,000-400,000 y >400,000 respectivamente ($P<0.05$). En TCSS hubo diferencia entre el grupo <200,000 (31.14%) y >400,000/ml (4.59%). DA y SC se encontró diferencia ($p<0.05$) en

todos los grupos. Se concluye que la mastitis clínica y subclínica afecta la tasa de concepción aunque MS no tuvo efecto en los DPS pero el elevado CCS entre parto y concepción afectó la tasa de fertilidad en vacas.

Palabras clave: Mastitis subclínica, Células somáticas. Fertilidad.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA.....	ii
ABREVIATURAS.....	iii
RESUMEN	v
ÍNDICE	vii
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Hipótesis	3
1.2 Objetivo general	4
1.3 Objetivos específicos	4
II. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 Respuesta inflamatoria en glándula mamaria	6
2.1.1 Respuesta inmune innata: primera línea de defensa de la glándula mamaria.	8
2.1.2 Respuesta inmune específica: segunda línea de defensa de la glándula mamaria.....	10
2.2 Mediadores químicos de la inflamación y sus posibles vías de alteración del comportamiento reproductivo en vacas	11
2.3 Impacto de las infecciones mamarias en la reproducción	13
2.3.1 Efectos en útero	15
2.3.2 Efectos de citocinas en los ovarios, desarrollo folicular, ovulación y cuerpo lúteo.....	16
2.3.3 Efectos en el desarrollo embrionario	18
2.3.4 Efectos en el eje hipotálamo-hipófisis-ovarios.....	18
2.4 Conteo de células somáticas en leche	20
2.5 Relación entre conteo de células somáticas y citocinas en glándula mamaria.....	20
2.6 Conteo de células somáticas y su relación con parámetros reproductivos.....	21
2.7 Métodos electrónicos de medición de células somáticas en leche.....	21
III. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1 Localización	23
3.2 Animales del estudio y condiciones medioambientales.....	23
3.3 Descripción del estudio	24
3.3.1 Protocolo primer estudio.....	24
3.3.2 Protocolo segundo estudio	28
3.4 Descripción de variables	29
3.5 Análisis estadístico	30

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
4.1 Primer estudio	32
4.2 Segundo estudio	37
V. CONCLUSIÓN	42
VI. RECOMENDACIONES	42
VII. BIBLIOGRAFÍA CITADA	43

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tasa de concepción a primer y segundo servicio en vacas Holstein sanas y enfermas de mastitis.....	36
Cuadro 2. Tasa de concepción en vacas Holstein con diferente conteo de células somáticas	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de flujo que muestra el posible mecanismo del efecto de la mastitis en la reproducción del ganado lechero.....	12
Figura 2. Vías potenciales por las cuales la infección en la glándula mamaria puede reducir la supervivencia embrionaria.....	19
Figura 3. Protocolo de muestreo de Células Somáticas en leche desde la fecha en que parió la vaca hasta su siguiente preñez.....	27
Figura 4. Días a primer servicio en vacas sanas (Barra azul), con mastitis subclínica (Barra gris) y mastitis clínica (barra negra).....	33
Figura 5. Días abiertos en vacas Holstein sanas (barra azul) y que presentaron mastitis subclínica (barra gris) y clínica (barra negra) antes de la concepción.....	34
Figura 6. Efecto de la ocurrencia de mastitis clínica y subclínica durante la lactancia temprana en el número de servicios por concepción en vacas.....	35
Figura 7. Días a primer servicio en vacas Holstein de acuerdo a la cantidad de células somáticas en leche (en miles/ml) entre el parto y la concepción.....	38
Figura 8. Días abiertos en vacas Holstein con diferente conteo de células somáticas en leche (en miles/ml) durante el parto y la concepción.....	39
Figura 9. Servicios por concepción en vacas Holstein con diferente conteo de células somáticas en leche (en miles/ml).....	39

I. INTRODUCCIÓN

La mastitis representa una de las principales enfermedades que afectan al ganado lechero alrededor del mundo (Asaf *et al.*, 2014), es una de las afecciones más costosas en los establos lecheros porque ocasiona disminución en la producción de leche, además de ser de alta prevalencia (Verschoor *et al.*, 2009; Furman *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015; Damm *et al.*, 2017). La mastitis es la inflamación de la glándula mamaria, se caracteriza por cambios en la composición de la leche y aumento de células somáticas (Soto *et al.*, 2003b, Hansen *et al.*, 2004; Giannechini *et al.*, 2014).

La mastitis subclínica se ha convertido en un problema global ya que puede resultar en un amplio espectro de consecuencias negativas (Rollin *et al.*, 2015). El CCS en leche ha sido ampliamente estudiado y además de ser un reflejo directo de la calidad de leche, se ha establecido como un indicador seguro de infección en glándula mamaria (Bradley y Green, 2004; Pinedo *et al.*, 2010).

Esta enfermedad tiene impactos económicos directos, incluyendo costos de diagnóstico, tratamiento, pérdidas de leche descartada, costos laborales y veterinarios y desecho de animales afectados, de igual manera, tiene efectos a largo plazo sobre la salud que influyen en la producción futura de leche (Schukken *et al.*, 2009).

Estudios realizados en Norte América (Risco *et al.*, 1999; Schrick *et al.*, 2001, Santos 2004; Moore *et al.*, 2005; Hertl *et al.*, 2010), Japón (Nguyen *et al.*, 2011), Israel (Lavon *et al.*, 2011) y Alemania (Klaas *et al.*, 2003) demuestran la

asociación de mastitis clínica y subclínica con interrupciones en el comportamiento reproductivo de vacas afectadas, así como otras investigaciones realizadas en México (Gastelum *et al.*, 2015) Argentina (Gómez-Cifuentes *et al.*, 2014) y Marruecos (Boujenane *et al.*, 2014). Esto debido principalmente al efecto de los mediadores químicos de la inflamación en los órganos reproductivos y en la interferencia con el perfil hormonal del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (Hockett *et al.*, 2005; Rahman *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2017).

Sin embargo existe información limitada con respecto a este fenómeno en la región norte de México, siendo la Comarca Lagunera la segunda región más importante en producción de leche del país de acuerdo a la Secretaría de Economía (SEDGIB, 2012). Bajo este escenario, se realizó un estudio con el objetivo de determinar el efecto de la mastitis en el comportamiento reproductivo.

1.1 Hipótesis

La mastitis subclínica y el aumento en la cantidad de células somáticas en leche tiene un efecto negativo sobre el comportamiento reproductivo en vacas Holstein.

1.2 Objetivo general

Evaluar el efecto de la mastitis subclínica y conteo de células somáticas en leche sobre el comportamiento reproductivo de vacas Holstein.

1.3 Objetivos específicos

1. Evaluar el comportamiento reproductivo de vacas Holstein enfermas de mastitis clínica, subclínica y sanas.
2. Evaluar la tasa de concepción a primer y segundo servicio en vacas sanas, enfermas de mastitis clínica y subclínica.
3. Agrupar el ganado Holstein de acuerdo a su conteo de células somáticas <200,000, entre 201,000-400,000 y >400,000/ml de leche, entre el periodo parto a concepción y determinar su comportamiento reproductivo.
4. Comparar días a primer servicio, número de servicios por concepción, días abiertos y tasa de concepción en vacas con diferente conteo de células somáticas en el periodo entre dos gestaciones consecutivas.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

La mastitis es la inflamación de la glándula mamaria (Gruet *et al.*, 2001; Soto *et al.*, 2003b, Hansen *et al.*, 2004; Giannechini *et al.*, 2014) y se caracteriza por aumento del conteo de células somáticas (CCS) que principalmente son leucocitos polimorfonucleares (PMN) macrófagos, linfocitos (Damm, *et al.*, 2017) y células epiteliales de descamación del tejido secretor, así como cambios patológicos en el tejido mamario (Novoa, 2003).

Las reacciones inflamatorias y de reparación del organismo están estrechamente relacionadas (Trigo y Valero, 2004) e incluso pueden ser perjudiciales (Robbins *et al.*, 2000).

Las sustancias moleculares producidas durante el proceso de inflamación se le conocen como mediadores químicos debido a que son las encargadas de regular estas respuestas, algunos de éstos mediadores como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α), Prostaglandinas (PG) y diversas Interleucinas (IL), éstas, son liberados a la circulación sistémica y aumentan su concentración y surten efecto en sitios diferentes de donde fueron producidos (Bluma *et al.*, 2000; Ohtsuka *et al.*, 2001).

Debido a que la inflamación tiene como objetivo final asilar la lesión, neutralizar agentes patógenos y preparar al organismo para la reparación (Robbins *et al.*, 2007), se esperaría que el resultado sea benéfico, paradójicamente se ha encontrado que tiene un efecto perjudicial en otros órganos desempeñando un papel dual en el organismo (Burvenich *et al.*, 2004).

La mastitis por una lado, afecta una gran proporción de vacas (Schrick, 2001) y por otro, es una de las principales causas de pérdidas económicas en establos lecheros alrededor del mundo (Santos *et al.*, 2004) ya que reduce la producción de leche, afecta su calidad, aumenta el desecho involuntario de animales y se elimina leche de animales tratados con antibióticos (Wilson *et al.*, 2008).

La eficiencia reproductiva es uno de los determinantes más importantes en la rentabilidad en los establos lecheros, estudios recientes indican que la mastitis tiene efectos considerables en el comportamiento reproductivo (Schrick, 2001; Boujenane *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2017). Sin embargo, se ha estudiado poco acerca del impacto de la patogénesis de la mastitis en otros órganos (Schukken *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2017).

2.1 Respuesta inflamatoria en glándula mamaria

El término referido a la respuesta inflamatoria dentro de la glándula mamaria es conocido como mastitis y es desencadenada en el huésped principalmente por infecciones bacterianas y traumatismos (Soto *et al.*, 2003b; Schukken *et al.*, 2011).

Los principales agentes infecciosos causantes de mastitis son *Staphilococcus aureus*, *S. aureus*; *Streptococcus uberis*, *S. uberis*; *Streptococcus agalactiae*, *S. agalactiae*; *Escherichia coli*, *E. coli* (Bradley y Green, 2004).

Actualmente se sabe que existen grandes diferencias en los tipos de reacción inflamatoria dependiendo de la especie bacteriana que invade la glándula mamaria del bovino (Schukken *et al.*, 2011). Sin embargo, la principal función de la respuesta inflamatoria es instaurar un mecanismo de defensa contra agentes patógenos, a la vez que se desarrolla el proceso de reparación de tejidos ante las

lesiones generadas (Robbins *et al.*, 2000). Si bien es cierto, este fenómeno está dirigido por leucocitos pero se necesita de sustancias que regulen las respuestas celulares, aquí es donde se vuelve complejo describir estos procesos en el tejido mamario en particular. En la siguiente revisión se pretende ampliar la descripción de estos procesos en la patogénesis de la mastitis haciendo una recopilación de las investigaciones sobre el tema.

Durante la respuesta inflamatoria se desencadena una serie de reacciones celulares mediadas por citocinas que tienen como principal función defender al organismo (Tizard, 2009).

Se ha demostrado que la fase aguda de la inflamación está dominada por las vías de señalización de las quimiocinas, citocinas, las vías de señalización de los receptores tipo Toll, así como la migración transendotelial de los leucocitos (Buitenhuis *et al.*, 2011). Estos mismos autores puntualizan que para tener una idea detallada el proceso inflamatorio del tejido mamario bajo escenarios específicos es necesario caracterizar e identificar la expresión de los genes que se activan en estos mecanismos.

En respuesta a la invasión bacteriana, la glándula mamaria es protegida por una gran variedad de mecanismos de defensa que pueden agruparse en dos categorías principales la inmunidad innata y la inmunidad específica (Riollet *et al.*, 2005). En la respuesta inmune innata participan principalmente neutrófilos, células Natural killer (NK), macrófagos, fagocitosis y el sistema de complemento y la respuesta inmune específica está influenciada por linfocitos T y linfocitos B. Los

linfocitos T se subdividen en CD4 cooperadores y CD8 o citotóxicos y supresores (Abbas *et al.*, 2008).

2.1.1 Respuesta inmune innata: primera línea de defensa de la glándula mamaria.

La inmunidad innata representa la primera barrera de defensa impidiendo y controlando las infecciones en el huésped, a su vez, sirve de advertencia para activar la inmunidad adaptativa (Abbas *et al.*, 2008). Esta respuesta se desencadena en las primeras etapas de la infección, ya que su función es reconocer patógenos que no se han encontrado antes (Uthaisangsook *et al.*, 2002).

Las células presentes en la leche, son principalmente linfocitos, macrófagos y PMN, en diferentes tipos de células inmunes que desempeñan un papel fundamental en respuestas inflamatorias dentro de la glándula mamaria (Damm, *et al.* 2017). Los linfocitos regulan la inducción y la supresión de respuestas inmunes. Los macrófagos son células fagocíticas activas capaces de eliminar las bacterias, desechos celulares y componentes de la leche (Rainard y Riollet, 2006).

En la glándula mamaria normal, los macrófagos son las células predominantes que actúan como centinelas a la mastitis causada por patógenos invasores. Una vez que éstos son detectados, los macrófagos liberan mensajeros químicos llamados quimioatrayentes que causan la migración de PMN a la infección (Paape *et al.*, 2002).

La principal tarea de PMN es defender bacterias invasoras al comienzo de una enfermedad inflamatoria (Damm, *et al.*, 2017). Mientras que los PMN están

fagocitando y destruyendo los patógenos invasores (Dios *et al.*, 2002; Rojas-Espinosa y Arce-Paredes, 2003; Abbas *et al.*, 2008; Tizard, 2009), liberan inadvertidamente mediadores químicos que inducen hinchamiento del citoplasma del epitelio secretor, desprendimiento de células secretoras y disminución de la actividad secretora (Burvenich *et al.*, 2004).

Las cicatrices permanentes resultarán en una pérdida de producción de leche. PMN actúan como amigos y como enemigos y son importantes componentes en el equilibrio entre la defensa mamaria y el daño (Burvenich *et al.*, 2004).

Se ha demostrado que la inmunomodulación de la respuesta inmune innata en la glándula mamaria está basada en aquellas citocinas como el factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF), las interleucinas IL1, IL2 que inducen respuestas en neutrófilos. El interferón bovino recombinante γ (IFN γ) que potencia las actividades de los linfocitos T, macrófagos y neutrófilos, modula las funciones de los neutrófilos de las glándulas mamarias durante el parto, período fisiológico crítico, cuando la vaca es más susceptible a las infecciones debido a la depresión de funciones inmunes (Rainard y Riollot, 2006).

Las principales reacciones de la defensa inmune innata se ha apreciado con bastante precisión al comprender mejor la interacción de patrones moleculares asociados a patógenos específicos (PAMPs) con sus receptores específicos en las células huésped (Abbas *et al.*, 2008).

Los receptores Toll-like (TLR) son sensores de células hospedadoras que están reconociendo patrones moleculares asociados a patógenos. Los receptores tipo Toll tales como el receptor Toll-like 4 (TLR4) y TLR2 son importantes en el

reconocimiento de patrones de moléculas microbianas los lipopolisacáridos LPS y PAMPs asociadas con infecciones bacterianas gram-negativas, mientras que el ácido lipoteicoico (LTA) es un patrón molecular asociado a un patógeno de al menos algunas de las bacterias gram-positivas (Rainard *et al.*, 2008).

2.1.2 Respuesta inmune específica: segunda línea de defensa de la glándula mamaria

El inicio de la inmunidad adaptativa implica, en primer lugar, tanto la presentación de antígenos y linfocitos. Los macrófagos juegan un papel clave como células presentadoras de antígenos y producción de citocinas en reacciones inflamatorias y presentación (Politis *et al.*, 1992; Fitzpatrick *et al.*, 1992). Los antígenos de bacterias se procesan en los macrófagos y aparecen en su membrana en asociación con Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) clase I o II. Por lo tanto reciben el nombre de células presentadoras de antígenos (Abbas *et al.*, 2008).

Además, los macrófagos secretan citoquinas que regulan la diferenciación celular de linfocitos T. Por ejemplo, se ha demostrado que la IL-12 mejora desarrollo de células CD8 + citotóxicas y que producen IFN- γ y estimula a las células T CD4 + hacia una respuesta de tipo Th1 (Trinchieri, 1995). Por el contrario, las citoquinas producidas por los linfocitos pueden actuar sobre las funciones de los macrófagos. Como ejemplo, la IL-10, secretada por células Th2, ha demostrado inhibir la capacidad de los macrófagos para estimular células Th1-T para producir IFN- γ (Fiorentino *et al.*, 1991).

2.2 Mediadores químicos de la inflamación y sus posibles vías de alteración del comportamiento reproductivo en vacas

Numerosos estudios han identificado una gran cantidad de citocinas producidas durante la respuesta inflamatoria que tienen un efecto perjudicial sobre las células del organismo, estas sustancias son vertidas a la circulación sistémica y se ha propuesto por algunos investigadores como Burvenich *et al.* (2004) que surten efectos en otros tejidos del cuerpo, modificando así la función normal.

Cada vez más es evidente que las reacciones del sistema inmunitario están en estrecha interacción con las reacciones fisiológicas normales del sistema endocrino en el organismo, aquellos mensajeros químicos del sistema inmune son conocidos como citocinas o citoquinas (Abbas *et al.*, 2008) y aquellos mensajeros químicos del sistema endocrino que desencadenan una respuesta en el cuerpo se le conocen como hormonas (Tortora y Derrickson, 2011).

Estas interacciones entre hormonas y citocinas pueden desencadenar en la vaca alteraciones en su fisiología normal y finalmente puede repercutir en la eficiencia de un establo lechero en términos de producción y reproducción (Asaf *et al.*, 2014). Sin embargo, gracias al avance en la investigación científica, cada vez más, se ha podido esclarecer y tener una idea bastante clara de cómo estos dos sistemas interactúan en el individuo. La esencia de la presente revisión sobre el efecto de la mastitis en el comportamiento reproductivo del ganado Holstein, es básicamente poder entender la interacción entre ambos sistemas, el inmunológico y la endocrinología de la reproducción.

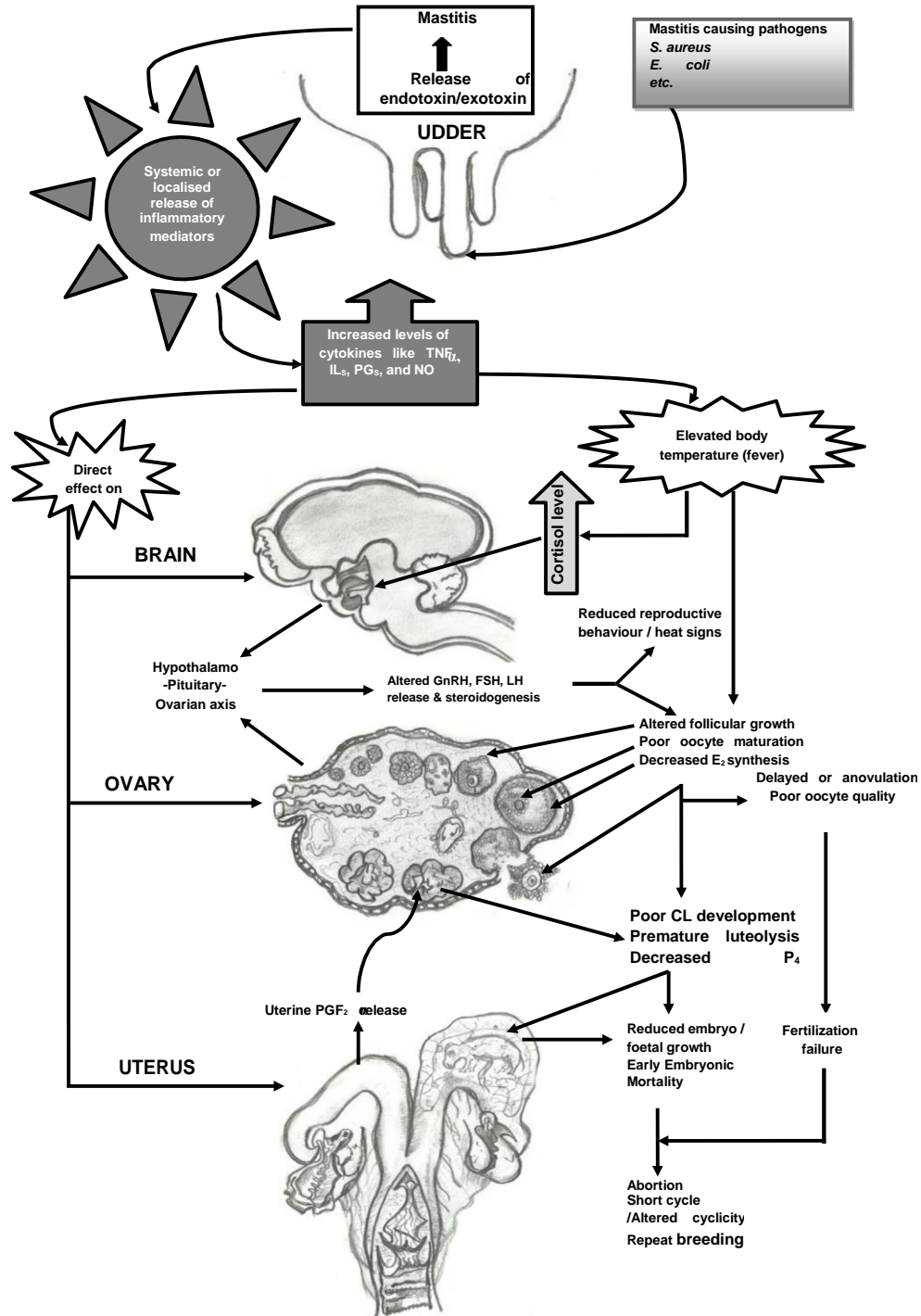


Figura 1. Diagrama de flujo que muestra el posible mecanismo del efecto de la mastitis en la reproducción del ganado lechero. Adaptado de Kumar *et al.* (2017).

La mastitis tiene múltiples acciones que obstaculizan la función endocrina normal en la vaca (figura 1). La pulsatilidad de la hormona luteinizante (LH) se reduce

considerablemente y posteriormente, la producción de 17β -estradiol (E2) (Hockett, *et al.*, 2005).

El TNFa producido por los macrófagos es un potente regulador del desarrollo folicular al controlar los efectos de hormona folículo estimulante (FSH) en la diferenciación de células de la granulosa (Karakji y Tsang, 1995).

2.3 Impacto de las infecciones mamarias en la reproducción

Numerosos estudios han reportado el efecto negativo de la mastitis en el desempeño reproductivo de la vaca (Schrick, 2001; Kumar *et al.*, 2017). Se ha demostrado también que esta enfermedad afecta la calidad y desarrollo de ovocitos en bovinos cuando ocurre alrededor de la inseminación artificial (IA) (Roth *et al.*, 2013). Y se ha demostrado el efecto de algunos mediadores químicos de la inflamación sobre la función ovárica, la ovulación y el desarrollo embrionario *in vitro* (Inza y Van, 2011).

Esto significa que los efectos de la mastitis no se limitan a la ubre sino que también a los órganos reproductores, afectando así a la eficiencia en el ganado lechero. Se informa de la relación entre la mastitis y la reproducción por varios autores a través de estudios retrospectivos (Barker *et al.* 1998; Gunay y Gunay, 2008).

La información disponible indica que la mastitis conduce a una disminución de la tasa de concepción, aberraciones en el ciclo estral, mayor número de SC (Moore *et al.*, 1991; Hertl *et al.*, 2010) en ganado el lechero, mortalidad de las células embrionarias tempranas o abortos (Risco *et al.*, 1999) y aumento en los DA (Barker *et al.*, 1998, Gunay y Gunay, 2008).

Hansen *et al.* (2004), Sugieren que las citocinas producidas durante la mastitis juegan un papel clave en la reducción de la supervivencia embrionaria, donde proponen un mecanismo global que modula la respuesta reproductiva mediante la producción de mediadores químicos de la inflamación durante la infección en glándula mamaria con la elevación de la temperatura, modificaciones en el perfil hormonal de la vaca, la interrupción en la maduración del ovocito y desarrollo embrionario. Sin embargo, los estudios clínicos sobre la comprensión de la patogénesis de la mastitis en la reproducción son limitados.

Wilson *et al.* (2008) demostraron que los diferentes tipos de patógenos de la mastitis (gram-negativas y bacterias gram-positivas) tienen diferencias en el efecto sobre el rendimiento reproductivo. El efecto del tiempo de ocurrencia de mastitis (antes o después de la IA), el tipo de patógenos, su virulencia, y gravedad o duración de la infección (aguda o crónica) sobre la reproducción sigue siendo controvertidos (Lavon *et al.*, 2011b; Kumar *et al.*, 2017).

Existe una gran cantidad de posibles mecanismos por los cuales la mastitis podría afectar negativamente a la fertilidad. Uno de ellos es que la elevación de la temperatura corporal coincidente con la mastitis compromete los procesos reproductivos (Hansen *et al.*, 2004).

Durante la mastitis se desencadena la producción de una gran variedad de moléculas bioactivas que pueden interrumpir la funcionalidad de tejidos del aparato reproductor (Hansen *et al.*, 2004).

Se ha encontrado que células derivadas de la leche procedentes de glándulas mamarias infectadas, contienen cantidades incrementadas de mRNA para la

interleucina IL1a, IL1b, TNFa, IL8 IL10 e IL12 (Riollet *et al.*, 2001), las cuales pueden alcanzar concentraciones elevadas en sangre durante la mastitis.

También se ha informado que las vacas con mastitis tienen una mayor concentración de 13,14-dihidro -15-ceto PGF2a (el principal metabolito de la PGF2a, PGFM) en la sangre después de la aplicación de oxitocina comparado con las vacas sanas lo que demuestra una alta sensibilidad uterina (Hockett *et al.*, 2000)

Se ha reportado que la PGF2a tiene un efecto negativo en el desarrollo embrionario en bovinos. De estas moléculas, el TNFa, el óxido nítrico (NO) y la PGF2a pueden afectar el desarrollo embrionario actuando bien sobre el ovocito o sobre el embrión en desarrollo (Soto *et al.*, 2003a).

2.3.1 Efectos en útero

Las citocinas también podrían ejercer otros efectos sobre el endometrio o el tejido oviductal que impiden el desarrollo embrionario. Un estudio realizado por Davidson *et al.* (1995) demostró que la IL-1b, por ejemplo, causa la proliferación reducida de células del estroma endometrial, aumenta la secreción de prostaglandina E2 (PGE2), PGF2 alfa y 13,14-dihidro 15-ceto PGF2 alfa (PGFM) por células epiteliales y estromales. El IFN-a reduce la proliferación de células epiteliales del oviducto (Kamwanja y Hansen, 1993).

No se sabe si la mastitis está asociada con una mayor síntesis de PGF2a y NO en el tracto reproductivo, pero esto es posible porque la síntesis de ambas moléculas está bajo regulación de citocinas. Por ejemplo, el TNFa, que puede elevarse en la

sangre durante la mastitis, (Bluma *et al.* 2000; Ohtsuka *et al.* 2001; Waller *et al.*, 2003) puede aumentar la síntesis endometrial de PGF2a (Skarzynski *et al.*, 2000). La IL1a también puede inducir la secreción endometrial de PGF2a. Entre las moléculas que inducen la NO sintasa se encuentran IFN- γ , TNFa, LPS y PGF2a. (Perez *et al.* 2001).

2.3.2 Efectos de citocinas en los ovarios, desarrollo folicular, ovulación y cuerpo lúteo.

Un estudio realizado por Spicer (1998) demostró que dosis crecientes de TNFa afecta la esteroidogénesis en células de la granulosa a nivel de folículos ováricos en bovinos. Posteriormente se demostró que el TNFa tiene efectos la proliferación de células tecales y de la granulosa en folículos pequeños y que inhibe la producción de receptores para LH (Spicer, 2001). Soto *et al.*, (2003a) demostró que esta citocina tiene efectos perjudiciales en ovocitos bovinos.

Lavon *et al.* (2009) Descubrió que el desarrollo folicular en vacas con mastitis crónica y subclínica era menor que en vacas no enfermas y que estaba asociado con bajos niveles de estradiol, estos mismos autores demostraron que la ovulación y el pico preovulatorio de LH era mayormente retrasado en vacas enfermas de mastitis, coincidiendo con un estudio realizado por Hansen *et al.* (2004). Bajo este mismo contexto (Morris *et al.*, 2009) las vacas enfermas de mastitis subclínica y cojera tienen una tasa menor de ovulación y Hockett *et al.* (2000) menciona puede haber irregularidades en los DPS debido al deficiente concentración de E2 y LH en vacas enfermas de mastitis.

Lavon *et al.* (2011b) midió la concentración en fluido folicular de E2, CYP11A1, CYP17A1, CYP19A1 que son enzimas del componente citocromo p450 que catalizan reacciones en la síntesis de esteroides y androstenediona en células de la teca y de la granulosa del folículo ovárico de vacas enfermas de mastitis subclínica encontrando concentraciones bajas comparado con vacas sanas.

Rahman *et al.* (2012) concluyó que la mastitis crónica produce una alteración en la estructura ovárica en vacas, que implica una reducción del lecho vascular y un aumento del tejido fibrótico, junto con un efecto directo sobre los ovocitos, y el factor de crecimiento y diferenciación (GDF-9) en folículos afectados > de 8mm. Todos estos son elementos esenciales que regulan la foliculogénesis lo que podría explicar, al menos en parte, cómo la mastitis crónica deprime la fertilidad.

En un estudio realizado por Furman *et al.* (2014) se indujo mastitis clínica y subclínica en vacas Holstein y se midió el crecimiento folicular encontrándose un menor desarrollo en los animales enfermos comparado con los animales sanos. De igual manera se reportó una disminución en la concentración de estrógenos en el líquido folicular en los animales enfermos de mastitis subclínica y un aumento en el CCS en leche. Huszenicza *et al.* (2005) reporta un retraso en la ovulación y luteólisis prematura en vacas enfermas de mastitis causando irregularidad en la ciclicidad. Roth *et al.* (2013) demostró el efecto de la mastitis en la competencia de ovocitos cultivados invitro de vacas enfermas y concluyó que hay menor calidad del ovocito y menor desarrollo de blastocito in vitro relacionado con elevación del CCS en leche por infección bacteriana.

2.3.3 Efectos en el desarrollo embrionario

Otros estudios realizados por Soto *et al.* (2003b) demostraron que el TNFa induce apoptosis en embriones con más de 9 células blastómeras e inhibe la maduración de ovocitos in vitro, lo que podría estar comprometiendo la supervivencia embrionaria subsiguiente.

2.3.4 Efectos en el eje hipotálamo-hipófisis-ovarios

La mastitis clínica que ocurre antes de la ovulación tiene un impacto negativo en la función endocrina y folicular, las enfermedades inflamatorias o infecciones estimulan la respuesta inmune que interfiere con la liberación pulsátil de LH. Karakji y Tsang, (1995) descubrieron que el TNFa inhibe la producción de receptores de LH estimulados por FSH en células de la granulosa y concluyen que tiene un efecto antigonadotrópico controlando incluso la proliferación de células de la granulosa.

Una razón posible para el aumento del número de servicios por concepción en vacas con mastitis es la inhibición en la secreción de factor de liberación de gonadotropina (GnRH) que conduce a una concentración deficiente para la ovulación, maduración de ovocitos, foliculogénesis y función luteal. Algunas citoquinas pueden disminuir la liberación de LH (McCann, *et al.*, 2000), en el ganado, por ejemplo, se ha demostrado que el IFN-a tiene tal acción bloqueando la secreción de esta hormona (Stoebel *et al.*, 1982; Padmanabhan *et al.*, 1983) así como el cortisol, una hormona cuya secreción puede ser elevada durante la mastitis (Hokett, *et al.*, 2000) o tras el tratamiento con endotoxinas (Kujjo *et al.*, 1995; Suzuki *et al.*, 2001).

El tratamiento de novillas con endotoxina cerca del estro puede conducir a la inhibición de la oleada de LH, la anovulación o la ovulación retardada y la formación de quistes. La Naloxona contrarrestó los efectos inhibitorios de la endotoxina sobre la secreción de LH en las vaquillas (Kujjo *et al.*, 1995).

La figura 2 muestra el fenómeno central que conduce a la mortalidad embrionaria asociada con la mastitis. El aumento de la secreción de citoquinas (producidas en los ganglios linfáticos mamarios y secretadas o producidas en otros tejidos en respuesta a las señales derivadas del organismo) a su vez modula la función reproductiva en varios niveles.

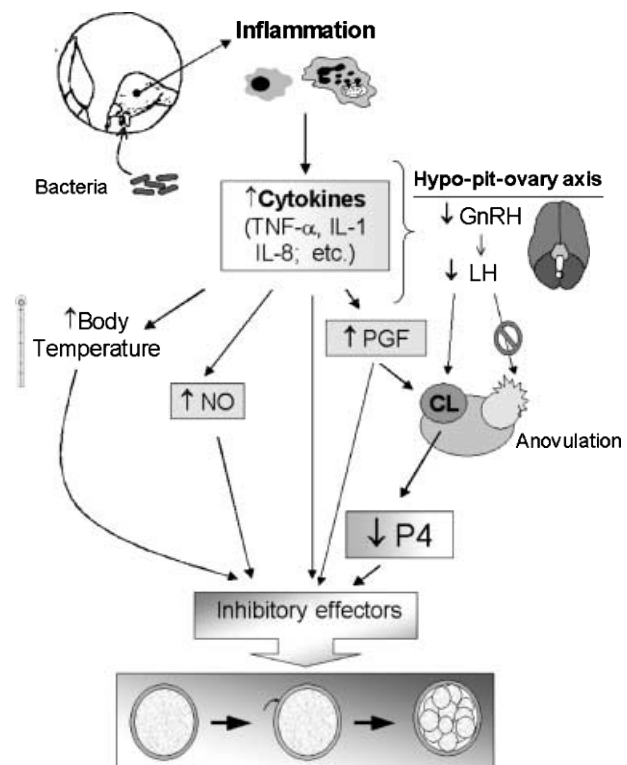


Figura 2. Vías potenciales por las cuales la infección en la glándula mamaria puede reducir la supervivencia embrionaria. Tomado de (Hansen *et al.*, 2004).

Las citoquinas liberadas durante la mastitis también pueden tener efectos directos en el ovario. La IL-6 bloquea la secreción de estradiol inducida por hormonas estimuladoras del folículo a partir de células de la granulosa bovina, especialmente de células aisladas de pequeños folículos (Alpizar *et al.*, 1994). Tanto el TNF- α

como el IFN- γ son citotóxicos para las células luteínicas en bovinas (Kamwanja y Hansen, 1993).

2.4 Conteo de células somáticas en leche

Durante las últimas décadas se ha implementado el conteo de células somáticas como un indicador de salud de la glándula mamaria en la industria lechera, permitiendo monitorear la prevalencia de mastitis subclínica en el hato (Pinedo y Meléndez, 2010; Damm *et al.*, 2017).

Se ha establecido a 200.000 células/ml de leche el punto de corte óptimo de CCS para distinguir entre vacas infectados y no infectados (Damm *et al.*, 2017).

2.5 Relación entre conteo de células somáticas y citocinas en glándula mamaria

Existe una relación entre la presencia de células somáticas en leche y las citocinas producidas en momentos específicos en la ubre, un estudio realizado por (Usman *et al.*, 2017) demostró la expresión de citocinas IL4, IL6, IL17A, IFN γ y TNFa, mediante la inmuoestimulación en glándula mamaria asociada a con un CCS elevado, más interesante aún, los autores mencionan que estas citocinas pueden ser identificadas en sangre y pueden ser posibles indicadores de mastitis en un futuro.

En otro estudio se demostró que la detección de citocina IL-6 en leche indica mastitis subclínica antes de que se identifique el CCS elevado. El autor concluyó que la detección de IL-6 en la leche podría ser un marcador de predicción fiable para mastitis subclínica (Sakemi, *et al.*, 2011).

La IL 8 es una citocina que sirve para estimular la migración de neutrófilos al sitio de inflamación local. Se ha encontrado un aumento en la síntesis de esta citocina

en células epiteliales del tejido mamario bajo la infección de *E. coli*. y *S. aureus* en la ubre de la vaca asociado a un aumento en el CCS (Chen *et al.*, 2015). Verschoor *et al.* (2009) reporta la asociación de IL10 con CCS en vacas y menciona que la modificación en el equilibrio de las sustancias pro y anti inflamatorias pueden predisponer a la susceptibilidad de mastitis en el ganado lechero.

2.6 Conteo de células somáticas y su relación con parámetros reproductivos

Un estudio realizado por Nguyen *et al.* (2011) determinó la relación entre el CCS con la incidencia de una reanudación anormal postparto de la ciclicidad ovárica y el rendimiento reproductivo en vacas lecheras, las vacas con CCS alto (más de 5000,00) tuvieron una mayor incidencia de fase lútea prolongada, mostraron una mayor incidencia de retraso en la primera ovulación post parto.

Al igual que lo reportado por Lavon *et al.* (2011a) mostraron tasas más bajas de concepción y más días desde el parto hasta la concepción que las vacas con un CCS de menos de 200,000. Las vacas de 5 o más partos tuvieron una mayor incidencia de CCS alta que las vacas en la primera y segunda paridades.

2.7 Métodos electrónicos de medición de células somáticas en leche

Las mediciones de SCC se realizan típicamente utilizando métodos cuantitativos, tales como el método Counter Coulter que cuenta el número de impulsos eléctricos resultantes de las partículas que pasan entre dos electrodos y el método Fossomatic (FSCC), que se basa en un principio óptico de fluorescencia (Bedolla *et al.*, 2007). La técnica FSCC implica la detección y enumeración de células por

medio de la tinción flouométrica del material genético a base de bromuro de ethidio (Martínez *et al.*, 2003).

El contador de células DeLaval Cell Counter (DCC) se ha desarrollado recientemente, es un contador cuantitativo de células somáticas con un bajo costo inicial y portabilidad superior (Kawai *et al.*, 2013), que funciona con batería portátil y tiene un medidor óptico de células somáticas. La leche se mezcla con reactivos que pasan al núcleo celular, lo cual permite su CCS, por medio de un sensor de fluorescencia (Bedolla *et al.*, 2007).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

La influencia de mastitis en el comportamiento reproductivo de vacas Holstein se estudió a través de la comparación de tres grupos: vacas que enfermaron de mastitis clínica, vacas enfermas de mastitis subclínica, comparado con vacas que nunca presentaron la enfermedad en el mismo periodo, durante la lactancia temprana, comprendido entre el parto y la concepción.

3.1 Localización

El estudio se realizó en el establo Ampuero localizado en el kilómetro 6.5 de la carretera Torreón-Mieleras del municipio de Torreón Coahuila, región conocida como Comarca Lagunera de los Estados Unidos Mexicanos. Situado en la latitud 26° Norte y a una altitud de 1,400 metros sobre el nivel del mar. La temperatura promedio es de 23.4° C, siendo la temperatura máxima de 40° C en junio-julio y la mínima de -3° C en diciembre; la precipitación pluvial promedio anual es de 230 mm³.

3.2 Animales del estudio y condiciones medioambientales

Los animales son de raza Holstein Friesian estuvieron totalmente estabulados en sistema de producción intensivo, se ordeñaron tres veces al día en sistema de ordeño tipo carrusel con un promedio de 37 litros de leche por día y de 9000-11000 kilos de leche por lactancia a 305 días. Alimentadas con raciones compuestas por forraje como la alfalfa, , silo de maíz y sorgo, avena, así como de concentrado a base de maíz roado, semilla de algodón y canola, suplementos minerales y vitamínicos suministradas tres veces al día en comederos en sombra dispuestos en los corrales y agua limpia a libre acceso. Las instalaciones se

encuentran altamente tecnificadas diseñadas para la zona semidesértica con sistemas de enfriamiento modelo Korral Kool Cooing Systems que es un sistema de enfriamiento a base de multi-boquillas con rociado de microgotas de agua a alta presión en forma de nebulización con aire y cortinas dispuestas a lo largo del corral. Los animales enfermos de mastitis clínica fueron tratados con antibióticos y desinflamatorios establecidos por veterinarios del estable.

3.3 Descripción del estudio

Se llevó a cabo la recopilación de datos del manejo reproductivo del estable y de registros de salud de los animales, se concentró la población a vacas que tuvieron más de 2 lactancias y menos de 4 lactancias. Así mismo, no se incluyeron a los animales que registraron enfermedades como cojeras, enfermedades reproductivas o cualquier enfermedad o tratamiento que pudieran alterar los resultados. También se descartó a los animales que no tuvieron datos completos (descritos en el protocolo) necesarios para el objeto de estudio.

3.3.1 Protocolo primer estudio

Se realizó un estudio retrospectivo en el cual se analizó un total de 884 registros de vacas Holstein Friesian de entre 2-4 lactancias de enero 2015 a enero 2016.

Paso 1. De estos registros se tomó los siguientes datos en cada animal:

- a) Fecha de parto.
- b) Fecha de primer servicio de inseminación artificial posparto:

La población inició época de servicios de inseminación artificial una vez que cumplió un periodo de espera voluntario que comprende

alrededor de 40 días después de parir. A partir de este momento se detectó en celo y se inseminó a cada vaca.

- c) Fecha de último servicio de inseminación artificial posparto, es decir, fecha de concepción
- d) Número de servicios de inseminación artificial que se dieron a cada vaca hasta su preñez.

A los animales de estudio se les realizó el diagnóstico de gestación por palpación y ultrasonografía transrectal a los 35 días después de la última inseminación artificial y sin presentación de celo posterior a ésta. Las vacas que repitieron celo después de la inseminación artificial y antes de la fecha de diagnóstico se les volvió a dar el servicio de IA y se aguardó 35 días para su diagnóstico de gestación. Este proceso se repitió hasta que quedó gestante el total de la población para poder determinar número de servicios de IA por concepción a cada individuo, así como, tasa de concepción a primer servicio y tasa de concepción a segundo servicio.

- e) Conteo de Células Somáticas:

Se determinó la cantidad de células somáticas por mililitro de leche a cada vaca mediante la prueba fluoro-opto-electrónico Fossomatic cada 30 días entre la fecha de parto hasta la fecha de concepción (figura 3).

- f) Estado de salud en glándula mamaria:

Los animales fueron revisados todo los días al ingresar a la sala de ordeño (3 veces al día) durante el periodo de estudio, donde se evaluó el estado de

salud de la ubre, aquellas vacas que presentaron signos clínicos de inflamación perceptibles se reportaron inmediatamente como enfermas de mastitis clínica. Los criterios para signos de mastitis clínica fueron principalmente, presencia de grumos en leche al momento del despunte en la ordeña, signos cardinales de inflamación como rubor, dolor, tumefacción de glándula mamaria, mismos que fueron reportados por personal capacitado del establo.

Paso 2. Se agrupó a los animales en tres clasificaciones:

1. Vacas Sanas

Vacas que presentaron un conteo de células somáticas por debajo de 200,000 por mililitro de leche y sin signos indicativos de inflamación, se clasificaron como sanas.

2. Vacas Enfermas de Mastitis Subclínica

Aquellas vacas que presentaron en una de sus lecturas por encima de 200,000 células por ml de leche y sin signos indicativos de inflamación, se clasificaron como enfermas de mastitis subclínica.

3. Vacas Enfermas de Mastitis Clínica

Aquellas vacas que presentaron signos de inflamación perceptibles, de acuerdo a los criterios mencionados en el inciso f) del paso 1, se clasificaron como vacas enfermas de mastitis clínica.

Paso 3. A cada grupo se les determinó las siguientes variables (descritas en el apartado 3.4):

- a) Tasa de concepción a primer servicio

- b) Tasa de concepción a segundo servicio
- c) Días a primer servicio
- d) Días abiertos
- e) Servicios por concepción

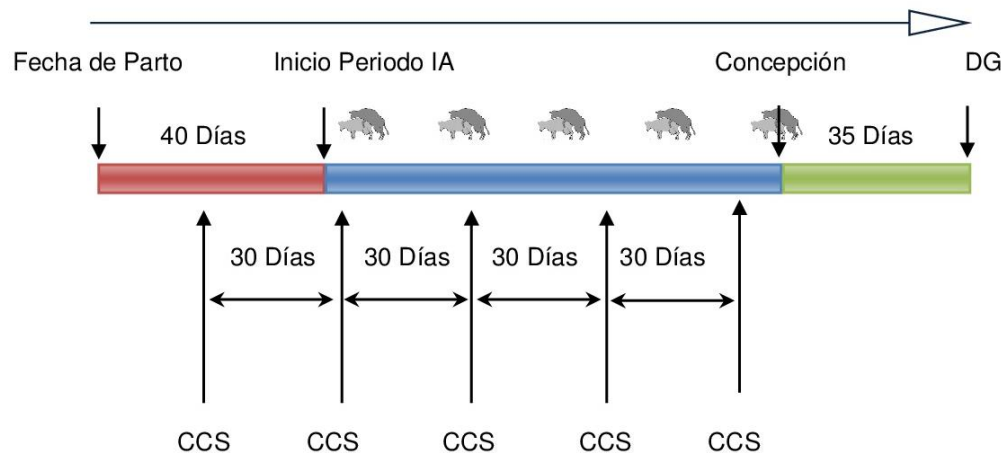


Figura 3. Protocolo de muestreo de Células Somáticas en leche desde la fecha

en que parió la vaca hasta su siguiente preñez.

- Fecha de Parto: Es el inicio de la lactancia en la que se midió el CCS.
- IA: Inseminación Artificial.
- Inicio Periodo IA: tiempo transcurrido entre la fecha de parto y el momento en que los animales iniciaron servicio de inseminación artificial (40 días).
- Concepción: Momento en que se preñó la vaca
- DG: Momento en que se realizó el Diagnóstico de Gestación por ultrasonografía transrectal, 35 días posteriores a la inseminación y sin repetición de celo entre la fecha de última inseminación y el diagnóstico de gestación.
- CCS. Conteo de Células Somáticas, se inició el muestreo en los siguientes 30 días después del parto y se repitió la muestra cada 30 días hasta su concepción.

El momento entre el muestreo y la fecha de servicio de IA no considero su relación. Ya que el objetivo fue considerar el CCS entre el parto y la concepción, de acuerdo a la cantidad se agruparon las vacas para el primer estudio en subclínicas (descrito en el apartado 3.3.1-paso 2) y para el segundo estudio (descrito en el apartado 3.3.2-Paso 2). De debido a que los animales que tuvieron

un periodo más corto entre el parto a la concepción su número de muestreos fue menor que los animales con periodos de parto a concepción más largo.

3.3.2 Protocolo segundo estudio

Paso 1. Se midió la cantidad de células somáticas presentes en leche a cada vaca con la intención de determinar cómo se comporta la reproducción de acuerdo a la a estas, para ello, se implementó la técnica de Fossomatic durante el periodo de fecha de parto a fecha de concepción, que implica la detección y enumeración de células por medio de la tinción flourométrica del material genético a base de bromuro de ethidio, realizando muestreos individuales con un intervalo de 30 días (figura 3).

Todas las vacas iniciaron su primer muestreo de leche para determinar el CCS en los siguientes 30 días posteriores al parto, a partir del cual se midió cada mes. El último muestreo que se tomó en cuenta fue el inmediato anterior a la fecha de concepción en cada vaca.

Dentro del manejo interno del establo las vacas cumplieron un periodo de espera voluntario de alrededor de 40 días posteriores al parto, después del cual aquellas vacas que se detectaron en celo iniciaron el periodo de servicios.

Paso 2. Se agruparon a los animales de acuerdo solo a su conteo de células somáticas en tres grupos.

Grupo 1. Aquellas vacas que mantuvieron su conteo de células somáticas por debajo de 200,000 por mililitro de leche.

Grupo 2. Vacas que en cualquiera de sus muestreos realizados tuvieron entre 201,000 y 400,000 células somáticas por mililitro de leche

Grupo 3. Los animales que en cualquiera de sus muestreos presentaron un conteo elevado mayor de 401,000 células somáticas por mililitro de leche.

Paso 3. De la misma manera se analizaron los mismos parámetros a cada grupo.

- a) Días a primer servicio
- b) Días abiertos
- c) Servicios por concepción
- d) Tasa de concepción a primer servicio
- e) Tasa de concepción a segundo servicio

3.4 Descripción de variables

Las variables a estudiar fueron las mismas aplicadas para el primer estudio y para el segundo estudio.

- a) Días a primer servicio

Este periodo se obtuvo de la diferencia de la fecha de primera inseminación y la fecha de parto.

- b) Días abiertos

Esta variable corresponde a los días transcurridos desde el parto a la fecha de concepción es decir la fecha de último servicio de inseminación artificial. También es conocido como periodo entre dos gestaciones consecutivas

- c) Servicios por concepción

Es la cantidad de veces que se realizó la inseminación artificial a cada vaca hasta su preñez.

d) Tasa de concepción a primer servicio

Corresponde al número de animales que quedaron preñados a la primera inseminación después del parto del total de animales inseminados. Se expresa en porcentaje.

Se calculó con la siguiente ecuación: $(TCPS) = \frac{TAP \times (100)}{TAIN}$

Donde:

TCPS: Tasa de Concepción a Primer Servicio

TAP: Total de Animales Preñados

TAIN: Total de Animales Inseminados

e) Tasa de concepción a segundo servicio

Corresponde al número de animales que quedaron preñados a la segunda inseminación después del parto del total de animales inseminados. Se expresa en porcentaje.

Se calculó con la siguiente ecuación: $(TCSS) = \frac{TAP \times (100)}{TAIN}$

Donde:

TCSS: Tasa de Concepción a Segundo Servicio

TAP: Total de Animales Preñados

TAIN: Total de Animales Inseminados

3.5 Análisis estadístico

El indicador epizootiológico se determinó de forma general por la siguiente expresión:

$$\% \textit{Prevalencia} = \frac{\textit{Total de vacas enfermas} \times (100)}{\textit{Total de vacas bajo riesgo de infecci3n}}$$

Se realiz3 un an3lisis estadístico descriptivo, como media, desviaci3n est3andar y coeficiente de variaci3n en cada una de las variables a estudiar. Se emple3 la prueba de Chi cuadrado para homogeneidad de par3metros y determinar diferencias por la presencia de mastitis en el comportamiento reproductivo.

En las variables reproductivas se determin3 la relaci3n entre la presencia o no de mastitis con dichas variables, a trav3s de una prueba de Chi cuadrado utilizando el paquete estadístico SYSTAT Versi3n para estudiantes.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluó un total de 884 animales de los cuales 584 no reportaron enfermedad de mastitis durante el periodo de parto a la concepción, 105 vacas (11.87%) presentaron mastitis subclínica y 195 (22,05%) se enfermaron de mastitis clínica durante este mismo periodo.

El 33,93 % del total de la población se enfermó de mastitis ya sea clínica o subclínica, similar a lo reportado por Klaas *et al.* (2003) donde reporta una prevalencia del 11% de mastitis clínica y 33% de mastitis subclínica a lo largo de 2 años en establos lecheros en Alemania. Boujenane *et al.* (2014) reportó un 26,9% de prevalencia anual de mastitis clínica.

4.1 Primer estudio

En la figura 4 se observa que la mastitis subclínica tiene poco efecto en días a primer servicios no significativo estadísticamente ($P < 0.05$) y vacas enfermas de mastitis clínica tienen en promedio 1.6 días más de diferencia para su primer servicio comparado con sanas, estadísticamente significativo ($P < 0.05$).

Estos resultados coinciden con Hansen *et al.* (2004); Ahmadzadeha *et al.* (2009).

En otro estudio realizado por Boujenane *et al.* (2014) reportó un incremento de 6.1 días más para la primera IA en vacas que presentaron al menos un evento de mastitis clínica.

Contrariamente a un estudio realizado por Klaas *et al.* (2003) donde reporta un efecto significativo en días a primer servicio cuando los animales se enfermaron de mastitis subclínica y sin ningún efecto cuando los animales presentaron mastitis clínica.

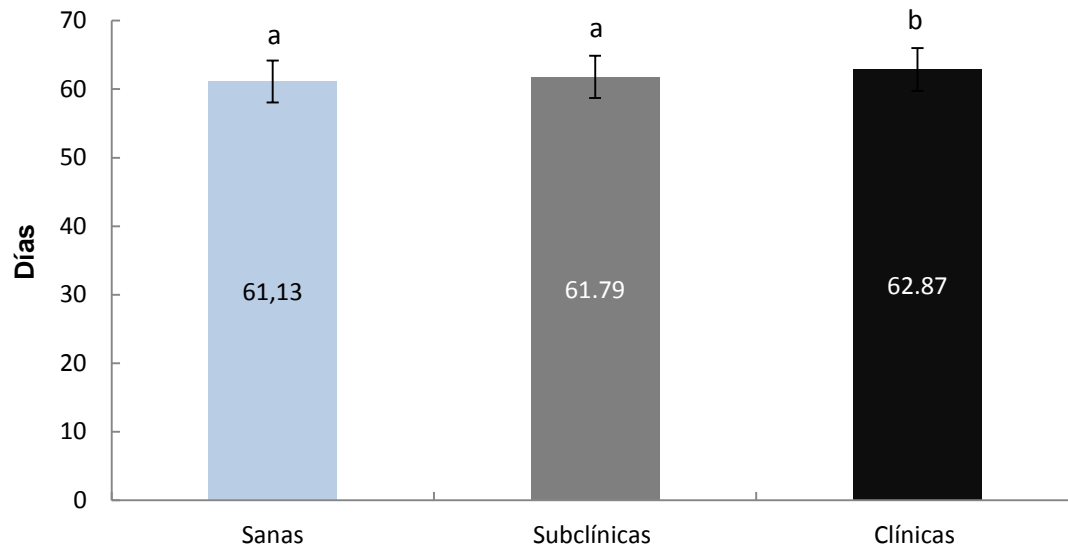


Figura 4. Días a primer servicio en vacas sanas (Barra azul), con mastitis subclínica (Barra gris) y mastitis clínica (barra negra).

Literales a y b difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

Un trabajo realizado por Spicer (1998) reportó que dosis crecientes de TNF α recombinante afectan la esteroideogénesis en ovarios bovinos, disminuye significativamente la producción de estradiol inducido por insulina y IGF-I en células de la granulosa de folículos bovinos y a través de la unión de TNF α a su propio receptor en células tecales causa inhibición de la producción de androstenediona inducida por insulina y LH en folículos grandes en estas mismas células. Lo que podría modificar la fisiología normal en vacas.

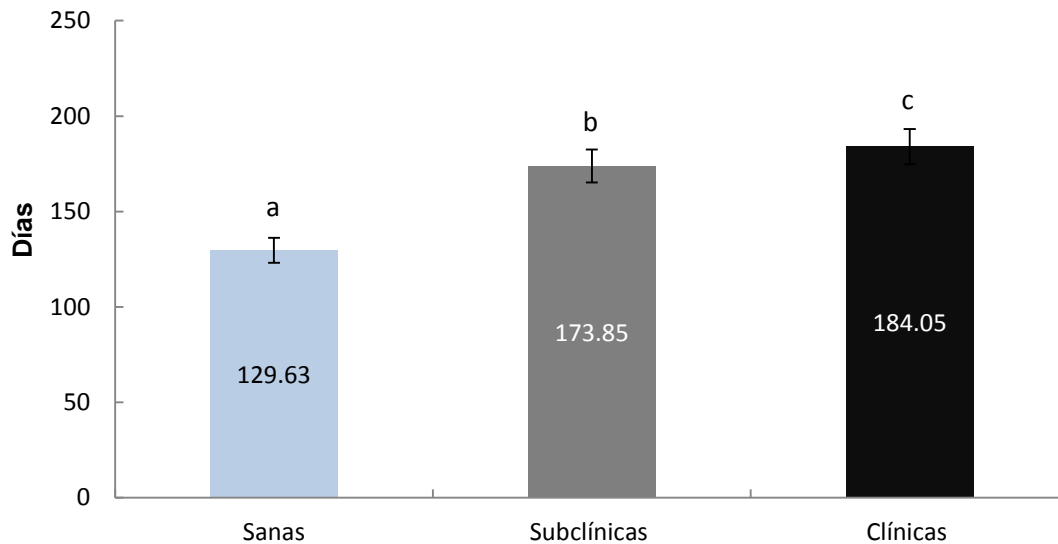


Figura 5. Días abiertos en vacas Holstein sanas (barra azul) y que presentaron mastitis subclínica (barra gris) y clínica (barra negra) antes de la concepción.

Literales a, b, c indica diferencia estadística entre las barras ($P < 0.05$)

Se observó el efecto de la mastitis en los DA en vacas Holstein aumentando el periodo aquellas vacas que se enfermaron ya sea de mastitis clínica o subclínica comparado con las sanas (figura 5), estos resultados fueron estadísticamente significativos ($P < 0.05$).

Lo que coincide con estudios realizados por Hansen *et al.* (2004); Santos *et al.*, (2004) y Gunay y Gunay (2008) donde se comparó vacas sanas y enfermas de mastitis clínica cuando ocurría antes de la primera IA y entre la primera IA y la concepción. Por el Contrario, Klaas *et al.* (2003) reporta que la mastitis subclínica no afectó los DA.

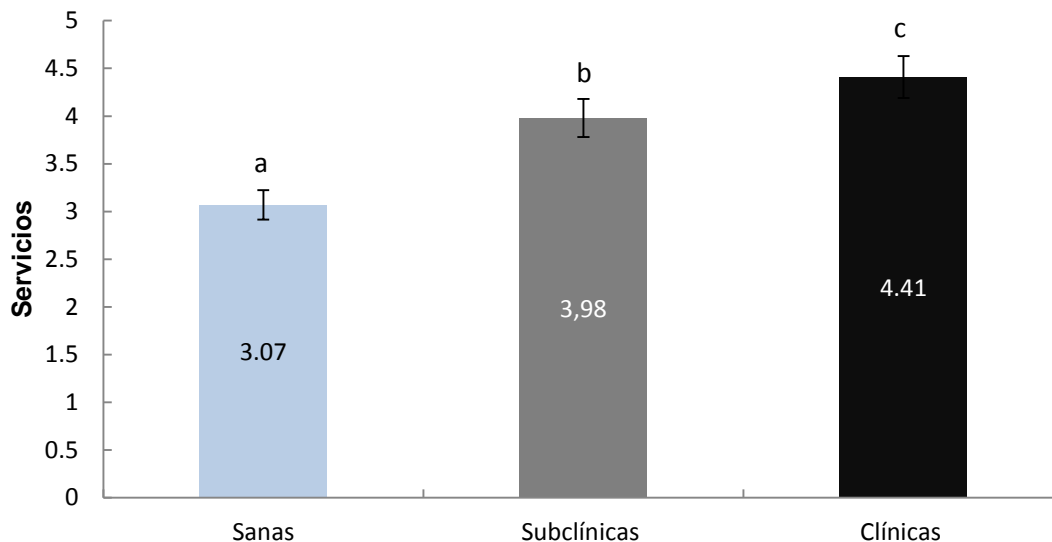


Figura 6. Efecto de la ocurrencia de mastitis clínica y subclínica durante la lactancia temprana en el número de servicios por concepción en vacas.

Literales a, b, c indica diferencia estadística entre las barras ($P < 0.05$)

El estudio reveló un incremento en el número de SC (figura 6) en vacas enfermas de mastitis comparado con vacas que nunca presentaron la enfermedad, estadísticamente diferente ($P < 0.05$). El efecto fue mayormente marcado en vacas con mastitis clínica, al igual que lo reportado por Schrick (2001) en comparación con los animales que enfermaron de mastitis subclínica.

Las vacas sanas tienen un menor número de SC en comparación con las vacas enfermas, lo que sugiere que la mastitis afecta la fertilidad.

En el cuadro 1 se muestra un efecto significativo en la fertilidad a primer servicio en vacas que no presentaron mastitis y aquellas que enfermaron de mastitis clínica y subclínica antes de la concepción, encontrándose una disminución en la concepción de 14.6% y 15,77% para mastitis subclínica y clínica respectivamente, comparado con vacas sanas.

Cuadro 1. Tasa de concepción a primer y segundo servicio en vacas Holstein sanas y enfermas de mastitis.

<i>Estado</i>	<i>TCPS</i>	<i>TCSS (n)</i>	<i>% Acumulativo (n)</i>
Sanas	26,02 (152/584) ^a	33,33 (144/432) ^a	50,68 (296/584) ^a
Subclínicas	11,42 (12/105) ^b	30,10 (28/93) ^b	38,09 (40/105) ^b
Clínicas	10,25 (20/195) ^c	18,85 (33/175) ^c	27,17 (53/195) ^c

TCPS=Tasa de Concepción a Primer Servicio. TCSS=Tasa de Concepción a Segundo Servicio

n= número de animales preñados/número de animales inseminados

Superíndices a, b, c, entre columnas son estadísticamente significativos (P<0.05)

Un estudio realizado por Hertl *et al.* (2014) reportó un efecto significativo en la disminución de probabilidad de concepción cuando ocurría la mastitis entre 0-21 días después de la IA a diferencia de este estudio estos autores mencionan que hubo poco efecto cuando la mastitis ocurría antes de la IA.

El efecto de la mastitis en la reproducción es un fenómeno estudiado en diferentes escenarios y de diversas formas, en la literatura se mencionan resultados muy diversos y discordantes respecto de este problema Boujenane *et al.* (2014) menciona un efecto de la enfermedad en los días a primer servicio pero ningún efecto en los días abiertos y servicios por concepción, diferente a Schrick *et al.* (2001); Gunay y Gunay, (2008) quienes mencionan que la mastitis clínica y subclínica tiene un efecto significativo en los días abiertos y servicios por concepción.

Este trabajo reveló un efecto significativo para los mismos parámetros reproductivos en vacas que presentaron mastitis ya sea subclínica o clínica antes del concepción, paradójicamente Hertl *et al.* (2014) reportó no haber encontrado ningún efecto significativo cuando la mastitis ocurría antes de la IA solo cuando esta se presenta después de la IA.

Lo que indica que hace falta realizar investigaciones más exhaustivas para poder comprender con mayor detalle estos fenómenos.

Estos descubrimientos pueden ser considerados como posibles vías o mecanismos por los cuales se afecta el comportamiento reproductivo en vacas bajo efectos inflamatorios en este caso con presencia de mastitis clínica y subclínica antes de la concepción.

4.2 Segundo estudio

Con el fin de ver la relación que existe entre el CCS en leche durante la lactancia temprana y el comportamiento reproductivo de vacas Holstein, se agrupó a los animales de acuerdo a la cantidad células somáticas presentes en la leche en tres grupos: <200,000/ml de leche, entre 201,000-400,000/ml y >400,000/ml y se comparó los DPS, DA y SC entre cada grupo. Todas las lecturas del CCS fueron realizadas después del parto y antes de la concepción.

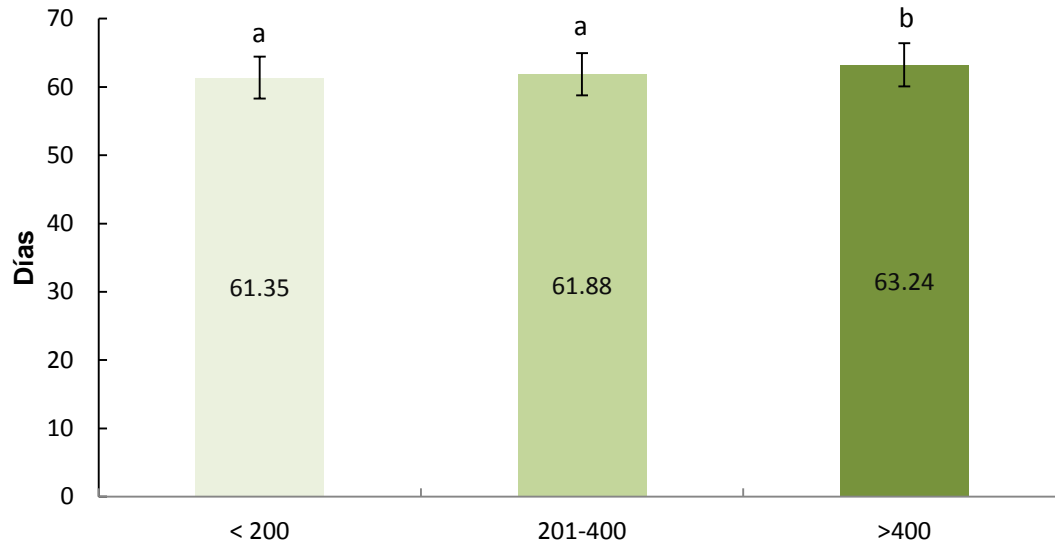


Figura 7. Días a primer servicio en vacas Holstein de acuerdo a la cantidad de células somáticas en leche (en miles/ml) entre el parto y la concepción.

Literales a, b indica diferencia estadística entre las barras ($P < 0.05$)

Se observa un incremento en los DPS en vacas que presentaron su CCS por encima de los 400,000/ml ($n=93$) de leche comparado con aquellas que se mantuvieron menor a 200,000 CCS/ml ($n=719$) de leche (figura 7). Los animales que tuvieron un CCS entre 201-400,000/ml ($n=72$) no presentaron diferencia estadística ($p > 0.05$) en comparación con las vacas que tuvieron conteos menores de 200,000/ml para la variable DPS.

Las vacas que presentaron un CCS por encima de 201,000/ml de leche (figura 8) tuvieron un incremento en la variable DA en comparación con el grupo de animales que se mantuvo por debajo de 200,000 células somáticas ($n=719$) en el mismo periodo, presentando diferencia estadística ($P < 0.05$).

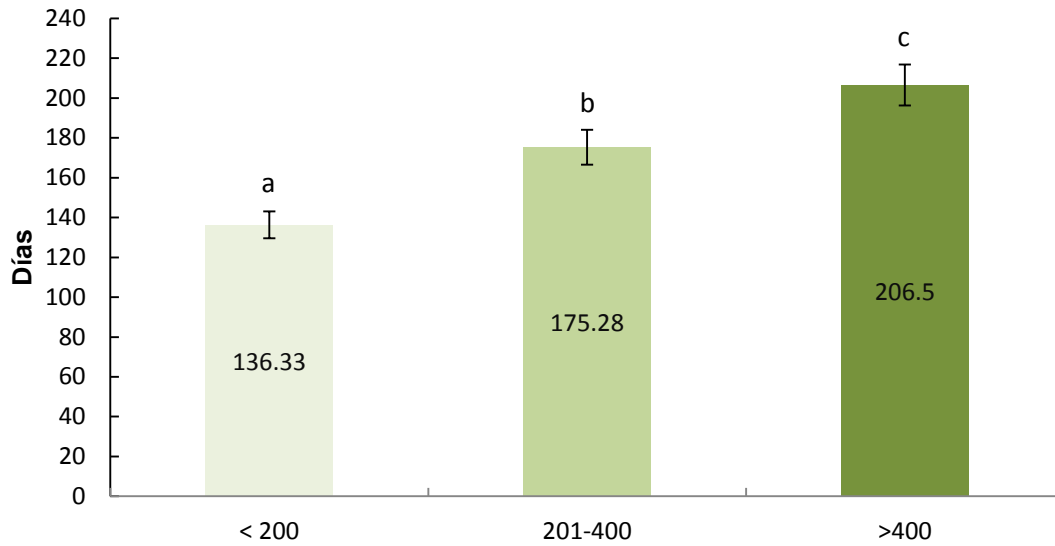


Figura 8. Días abiertos en vacas Holstein con diferente conteo de células somáticas en leche (en miles/ml) durante el parto y la concepción. Literales a, b, c indica diferencia estadística entre las barras ($P < 0.05$)

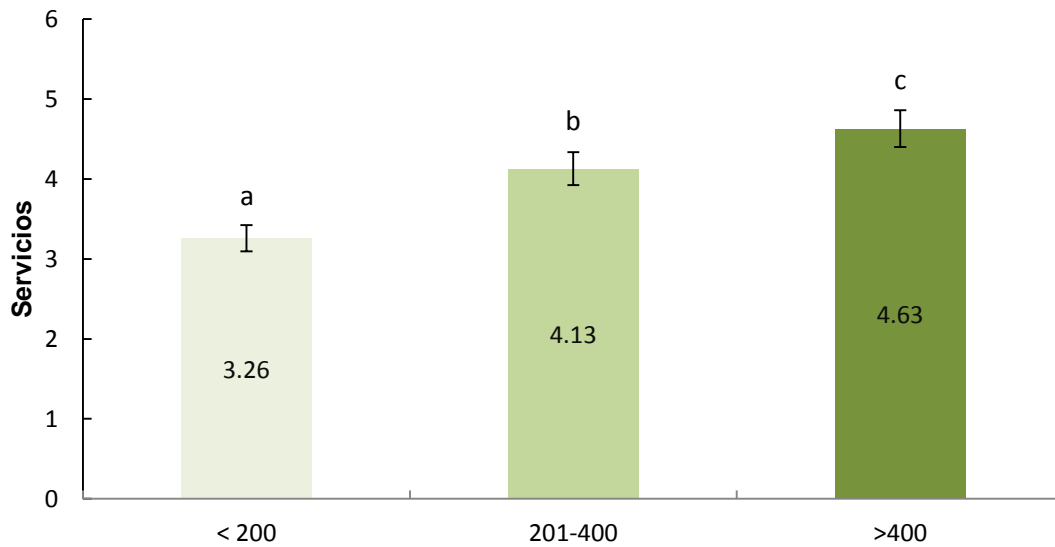


Figura 9. Servicios por concepción en vacas Holstein con diferente conteo de células somáticas en leche (en miles/ml). Literales a, b, c indica diferencia estadística entre las barras ($P < 0.05$)

El grupo de vacas con un CCS >400,000/ml (n=93) (figura 8) fue mayormente afectado para esta variable DA con una diferencia de 70.17 días más que el grupo con un CCS <200,000/ml y de 31.22 día más que el grupo 201,000-400,000/ml (n=72) (P<0.05).

En relación al número de servicios de IA por concepción (figura 9), aquellas vacas que presentan un elevado CCS, entre 200,000-400,000 (n=72) y >400,000 (n=93) requieren más SC comparado con las vacas que tienen un CCS menor a 200,000/ml (n=719).

Estos resultados coinciden con un estudio realizado por Pinedo y Meléndez (2010) en el centro sur de Chile encontró una relación positiva con la variación en el CCS en tanque y los parámetros reproductivos.

Cuadro 2. Tasa de concepción en vacas Holstein con diferente conteo de células somáticas

CCS*	TCPS (n)	TCSS (n)	% Acumulativo (n)
<200	23,64 (170/719) ^a	31,14 (171/549) ^a	47,42 (341/719) ^a
201-400	11,11 (8/72) ^b	31,25 (20/64) ^a	38,88 (28/72) ^b
>400	6,45 (6/93) ^c	4,59 (4/87) ^b	10,75 (10/93) ^c

* Conteo de Células Somáticas en miles por mililitro de leche

TCPS=Tasa de Concepción a Primer Servicio. TCSS=Tasa de Concepción a Segundo Servicio

n= número de animales preñados/número de animales inseminados

Superíndices a, b, c, entre columnas son estadísticamente significativos (P<0.05)

En el cuadro 2 se observa que las vacas que mantuvieron un CCS menor a 200,000 tuvieron una TCPS de 23,64 % en comparación con el 11,11% y 6,45% obtenida de los animales con un CCS entre 201,000-400,000/ml y >400,000 respectivamente, resultados estadísticamente diferente ($P < 0.05$).

En la TCSS no se encontró diferencias estadística entre el grupo de vacas que mantuvieron un CCS <200,000 comparado con vacas con un CCS de 201-400,000/ml.

Finalmente al medir la tasa de concepción se observó que el 47.42% de las vacas que mantuvieron su CCS <200,000 quedaron gestantes entre el primer y segundo servicio, para el grupo de animales que tuvo su CCS entre 201,000-400,000/ml y >400,000 la TCPS y la TCSS fue del 38,88% y 10,75% respectivamente. Estadísticamente significativo ($P < 0.05$).

V. CONCLUSIÓN

La mastitis ya sea clínica o subclínica redujo el rendimiento reproductivo en vacas Holstein, así como en los animales que aumentaron el conteo de células somáticas en leche entre el parto y la concepción se encontró una disminución en la tasa de concepción. Hace falta investigar a fondo dichos fenómenos con el fin de establecer y desarrollar nuevas medidas terapéuticas que contrarresten los efectos de la mastitis subclínica en la fertilidad, como el uso de antiinflamatorios específicos o la inmunomodulación en glándula mamaria con citocinas.

VI. RECOMENDACIONES

Considerar la mastitis como un factor importante en el desempeño reproductivo del ganado lechero.

De acuerdo a los resultados se sugiere no dar servicio de IA a las vacas que hayan presentado mastitis clínica en los días anteriores al celo y alrededor de la IA, debido a la tasa de concepción menor que las sanas.

Desarrollar investigación referente el análisis de mediadores químicos de la inflamación tanto en sangre como en leche, que estén asociados con un elevado conteo de células somáticas, para implementar este tipo indicadores con los que se pudieran tomar decisiones en el campo de dar o no servicio de IA a vacas afectadas, esto basado en los resultados obtenidos en este estudio: Vacas con un CCS >400/ml tienen una tasa de concepción menor que las vacas con un CCS <4000.

VII. BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Abbas, A. K., Litchman, A. H. and Pillai, S. (2008). Inmunología Celular y Molecular. 6ª Edición. Elsevier. 576 p.
2. Ahmadzadeha, A., Frago, F., Shafii B., Dalton, J. C. Price W. J. and M. A. McGuire. (2009). Effect of clinical mastitis and other diseases on reproductive performance of Holstein cows. *Animal Reproduction Science* 112: 273–282.
3. Alpizar, E. and Spicer, L. J. (1994). Effects of interleukin-6 on proliferation and follicle-stimulating hormone-induced estradiol production by bovine granulosa cells in vitro: dependence on size of follicle. *Biol Reprod.* 50:38–43.
4. Asaf, S., Leitner, G., Furman, O., Lavon, Y., Kalo, D., D. Wolfenson and Z. Roth. (2014). Effects of *Escherichia coli*- and *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in lactating cows on oocyte developmental competence. *Society for Reproduction and Fertility.* 147 33–43.
5. Barker, A., Schrick, F., Lewis, M., Dowlen, H. and Oliver, S. (1998). Influence of clinical mastitis during early lactation on reproductive performance of Jersey cows. *Journal of Dairy Science.* 81:1285–1290.
6. Bedolla, C. C., Castañeda V. H. y Wolter, W. (2007). Métodos de detección de la mastitis bovina (Methods of detection of the bovine mastitis). *Rev. electrón. vet.* Vol. VIII, N° 9.
7. Bluma, J.W., Dosogne, H., Hoeben, D., Vangroenweghe, F., Hammona, H. M., Bruckmaiera, R. M. and Burvenich. C. (2000). Tumor necrosis factor- α and nitrite/nitrate responses during acute mastitis induced by *Escherichia*

- coli* infection and endotoxin in dairy cows. Domestic Animal Endocrinology 19:223–235.
8. Boujenane, I., Aimani, J. E. and By K. (2014). Effects of clinical mastitis on reproductive and milk performance of Holstein cows in Morocco. Trop Anim Health Prod.
 9. Bradley, A. J. and Green, M. J. (2004). The importance of the nonlactating period in the epidemiology of intramammary infection and strategies for prevention. Vet Clin Food Anim 20,547-568.
 10. Boujenane, I., Aimani, J. E. and By, K. (2014). Effects of clinical mastitis on reproductive and milk performance of Holstein cows in Morocco. Trop Anim Health Prod.
 11. Buitenhuis, B., Røntved, C. M., Edwards, S. M., Ingvarsen, K. L. and Sørensen, P. (2011). In depth analysis of genes and pathways of the mammary gland involved in the pathogenesis of bovine *Escherichia coli*-mastitis. BioMed Central Genomics 12,130.
 12. Burvenich, C., Monfardini, E., Mehrzad, J., Capuco, A. V. and Paape, M. J. (2004). Role of neutrophil polymorphonuclear leukocytes during bovine coliform mastitis: physiology or pathology? Verh K Acad Geneesk Belg. 66(2),97-150.
 13. Chen, R., Wang, Z., Yang, Z., Zhu, X., Ji, D. and Mao, Y. (2015). Association of IL8 -105G/A with Mastitis Somatic Cell Score in Chinese Holstein Dairy Cows, Animal Biotechnology, 26:2, 143-147.
 14. Damm, M., Holm, C., Blaabjerg, M., Bro, M.N. and Schwarz, D. (2017). Differential somatic cell count—A novel method for routine mastitis

- screening in the frame of Dairy Herd Improvement testing programs *J. Dairy Sci.* 100:1–15.
15. Davidson, J. A., Tiemann, U., Betts, J. G. and Hansen, P. J. (1995). DNA synthesis and prostaglandin secretion by bovine endometrial cells as regulated by interleukin-1. *Reprod Fertil Dev.* 7:1037–1043.
 16. Dios, P. D., Hermida, A. O., and Feijoo, J. F. (2002). Alteraciones cuantitativas y funcionales de los neutrófilos. *Med Oral*, 7, 206-21.
 17. Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Vieira, P., Mosmann, T. R., Howard, M., K. W. Moore and A. O'Garra. (1991). IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol*, 146 (10) 3444-3451.
<http://www.jimmunol.org/content/146/10/3444>
 18. Fitzpatrick, J. L., Cripps, P. J., Hill, A. W., P. M. Bland. and C. R. Stokes. (1992). MHC class II expression in the bovine mammary gland. *Vet Immunol Immunopathol* 32:13-23, 1992.
 19. Furman, O., Leitner, G., Roth, Z., Lavon, Y., Jacoby, S. and Wolfenson, D. (2014). Experimental model of toxin-induced subclinical mastitis and its effect on disruption of follicular function in cows, *Theriogenology*. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.08.002.
 20. Gastelum S. B., Martínez B. E. y A. A. Porras. (2015). Efecto de la mastitis clínica en el desempeño reproductivo de vacas Holstein en lactancia. *Memorias del XXXIX Congreso Nacional e Internacional de Buiatría*, Lic. Luis Bravo Tornel. 780-783.
 21. Giannechini, R., Concha, C., Delucci, I., Gil J., Salvarrey, L. and Rivero, R. (2014). Mastitis bovina, reconocimiento de los patógenos y su resistencia

- antimicrobiana en la Cuenca Lechera del Sur de Uruguay. *Rev Veterinaria Montevideo*. Vol. 50 No. 196.
22. Gómez-Cifuentes, C. I., Molineri, A. I., Signorini, M. L., D., Scandolo, and L. F., Calvino. (2014). The association between mastitis and reproductive performance in seasonally calved dairy cows managed on a pasture-based system. *Arch Med Vet* 46, 197-206.
23. Gruet, P., Maincent, P., Berthelot, X. and Kaltsatos, V. (2001). Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Elsevier Advanced Drug Delivery Reviews* 50,245 –259.
24. Gunay, A. and Gunay, U. (2008). Effects of Clinical Mastitis on Reproductive Performance in Holstein Cows. *ACTA VET. BRNO*, 77: 555-560.
25. Hansen, P. J., Soto, P. and Natzke, R, P. (2004). Mastitis and fertility in cattle—possible involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality. *American Journal of Reproductive Immunology*. 51:294–301.
26. Hertl, J. A., Gröhn, J. A., Leach, J. A., Bar, D., Bennett, G. J., González, R. N., Rauch, B. J., Welcome, F. L., Tauer, L. W. and Schukken, Y. H. (2010). Effects of clinical mastitis caused by gram-positive and gram-negative bacteria and other organisms on the probability of conception in New York State Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 93:1551–1560.
27. Hertl, J. A., Schukken, Y. H., Welcome, F. L., Tauer, L. W. and Gröhn, Y. T. (2014). Effects of pathogen-specific clinical mastitis on probability of conception in Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci*. 97 :6942–6954.

28. Hockett, M. E., Hopkins, F. M., Lewis, M. J., Saxton, A. M., Dowlen, H. H., Oliver, S. P. and Schrick, F. N. (2000). Endocrine profiles of dairy cows following experimentally induced clinical mastitis during early lactation *Animal Reproduction Science* 58: 241–251.
29. Hockett, M. E. Almeida, R. A. Rohrbach, N. R. Oliver, S. P., H. H. Dowlen, and F. N. Schrick. (2005). Effects of Induced Clinical Mastitis During Preovulation on Endocrine and Follicular Function. *J. Dairy Sci.* 88:2422–2431.
30. Huszenicza, G., Janosi, S., Kulcsar, M., Korodi, P., Reiczigel, J., Katai L., Peters, A. R. and De Rensis, F. (2005). Effects of Clinical Mastitis on Ovarian Function in Post-partum Dairy Cows. *Reprod Dom Anim.* 40, 199–204.
31. Inza, R., Van, G. 2011. Citoquinas y ovulación. *Revista SAEGRE.* Vol. 18: No.
32. Kamwanja, L. A. and Hansen, P. J. (1993). Regulation of proliferation of bovine oviductal epithelial cells by estradiol: interactions with progesterone, interferon and interferon- α . *Horm Metab Res.* 25:500–502.
33. Karakji, E.G., Tsang, B. K. (1995) Tumor Necrosis Factor Alpha Inhibits Rat Granulosa Cell Plasminogen Activator Activity In Vitro during Follicular Development' *Biology of Reproduction* 52, 745-752.
34. Kawai, K., Hayashi, T., Kiku, Y., Chiba, T., Nagahata, H., Higuchi, H., ... & Sato, R. (2013). Reliability in somatic cell count measurement of clinical mastitis milk using DeLaval cell counter. *Animal Science Journal*, 84(12), 805-807.

35. Klaas, I. C., Wessels, U., Rothfuss, H., Tenhagen, B.-A., Heuwieser, W. and Schallenberger, E. (2003). Factors affecting reproductive performance in German Holstein-Friesian cows with a special focus on postpartum mastitis. *Livestock Production Science*, 86, 233–238.
36. Kujjo, L. L., Bosu, W. T. and Perez, G. I. (1995). Opioid peptides involvement in endotoxin-induced suppression of LH secretion in ovariectomized Holstein heifers. *Reprod Toxicol.* 9:169–174.
37. Kumar, N., Manimaran, A., Kumaresan, A., Jeyakumar, S., Sreela, L., Mooventhan, P. and Sivaram, M. (2017). Mastitis effects on reproductive performance in dairy cattle: a review. *Trop Anim Health Prod.*
38. Lavon, Y., Leitner, G., Voet, H. and Wolfenson, D. (2009). Naturally occurring mastitis effects on timing of ovulation, steroid and gonadotrophic hormone concentrations, and follicular and luteal growth in cows. *J. Dairy Sci.* 93:911–921.
39. Lavon, Y., Ezra, E., Leitner, G. and Wolfenson, D. (2011a). Association of conception rate with pattern and level of somatic cell count elevation relative to time of insemination in dairy cows. *Journal of Dairy Science.* 94(9). 4538–4545.
40. Lavon, Y., Leitner, G., Klipper, E., Moallem, U., Meidan, R., H. and Wolfenson, (2011b). Subclinical, chronic intramammary infection lowers steroid concentrations and gene expression in bovine preovulatory follicles. *Domestic Animal Endocrinology* 40:98–109.

41. Martínez, J. R, Gonzalo, C., J. A. Carriedo and F. San Primitivo. (2003). Effect of Freezing on Fossomatic Cell Counting in Ewe Milk. *J. Dairy Sci.* 86:2583–2587.
42. McCann, S. M., Kimura, M., Karanth, S., Yu, W. H., Mastronardi, C. A. and Rettori, V. (2000). The mechanism of action of cytokines to control the release of hypothalamic and pituitary hormones in infection. *Ann NY Acad Sci.* 917:4–18.
43. Moore, D. A., Overton, M. W., Chebel, R. C., Truscott, M. L. and BonDurant, R. H. (2005). Evaluation of factors that affect embryonic loss in dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 226, 1112.
44. Morris, M. J., Walker, S. L., Jones, D. N., Routly, J. E., Smith R. F. and Dobson H. (2009). Influence of somatic cell count, body condition and lameness on follicular growth and ovulation in dairy cows. *Theriogenology* 71: 801–806.
45. Nguyen, T. C., Nakao, T., Gautam, G., Su, L. T., Ranasinghe, M. S., Ranasinghe, B. K. and Yusuf, M. (2011). Relationship between milk somatic cell count and postpartum ovarian cyclicity and fertility in dairy cows. *Acta Veterinaria Hungarica*, 59: 349–362.
46. Novoa, R. M. (2003). Evaluación epizootiológica y económica de la mastitis bovina en rebaños lecheros especializados de la provincia de Cienfuegos (tesis de maestría). Universidad Agraria de la Habana. Cuba.
47. Ohtsuka, H., Kudo, K., Mori, K., Nagai, F., Hatsugaya, A., Tajima, M., Tamura, K., Hoshi, F., Koiwa, M. and Kawamura, S. (2001). Acute phase

- response in naturally occurring coliform mastitis. *J Vet Med Sci.* 63:675–678.
48. Paape, M. J., Shafer-Weaver, K., Capuco, A. V., Oostveldt, K. V. and Burvenich, C. (2002). Immune Surveillance of Mammary Tissue by Phagocytic Cells. *Immune surveillance by phagocytic cells.* 30:259-277.
49. Padmanabhan, V., Keech, C. and Convey, E. M. (1983). Cortisol inhibits and adrenocorticotropin has no effect on luteinizing hormone-releasing hormone-induced release of luteinizing hormone from bovine pituitary cells in vitro. *Endocrinology.* 112:1782–1787.
50. Perez, M. S., Franchi, A. M., Viggiano, J. M., Herrero, M. B. and Gimeno, M. (1999). Effect of prostaglandin F2a (PGF2a) on oviductal nitric oxide synthase (NOS) activity: possible role of endogenous NO on PGF2a-induced contractions in rat oviduct. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 56:155–166.
51. Pinedo, P. J. and Meléndez, P. (2010). Patrones temporales de recuento de células somáticas, grasa, proteína y nitrógeno ureico en leche de estanque y su asociación con fertilidad en ganado lechero en la zona centro-sur de Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria*, vol. 42, (1),41-48.ç
52. Politis, I., Zhao, X., McBride, B. W. and J. H. Burton. (1992). Function of bovine mammary macrophages as antigen-presenting cells. *Vet Immunol Immunopathol* 4, 399-410.
53. Rahman, M. M., Mazzilli, M., Pennarossa, G., Brevini, T. A., Zecconi, A. and Gandolfi, F. (2012). Chronic mastitis is associated with altered ovarian follicle development in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 95, 1885–1893.

54. Rainard, P. and Riollot, C. (2006). Innate immunity of the bovine mammary gland. *Veterinary Research, BioMed Central*. 37 (3), 369-400.
55. Rainard, P., Riollot, C., Berthon, P., Cunha, P., Fromageau, A., Rossignol, C. and Gilbert, F. B. (2008). The chemokine CXCL3 is responsible for the constitutive chemotactic activity of bovine milk for neutrophils. *Molecular Immunology*. 45:4020–4027.
56. Riollot, C., Rainard, P. and Poutrel, B. (2001). Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. *J Dairy Sci*. 84:1077–1084.
57. Riollot, C., Rainard, P. and Poutrel, B. (2005). Cells and Cytokines in Inflammatory Secretions of Bovine Mammary Gland. *Laboratoire de Pathologie Infectieuse et Immunologie, INRA*. 30,247-258.
58. Risco, C. A., Donovan, G. A. and Hernandez, J. (1999). Clinical mastitis associated with abortion in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 82, 1684–1689.
59. Robbins, S., Cotran, S., Kumar, V. y Collins, T. (2000). *Patología estructural y funcional*. Sexta edición. Mc GRAW HILL INTERAMERICANA. 1427 p
60. Robbins, S., Cotran, S., Mitchell, R. N., Kumar, V., Abbas, A. K. and Fausto, N. (2007). *Compendio de patología estructural y funcional*. Séptima edición. Elsevier imprint. 876 p.
61. Rojas-Espinosa, O., y Arce-Paredes, P. (2003). Fagocitosis: mecanismos y consecuencias Primera parte. *Bioquímica*, 28(4), 19-30.

62. Rollin, E., K.C., Dhuyvetter, and Overton, M. W. (2015). The cost of clinical mastitis in the first 30 days of lactation: An economic modeling tool. *Preventive Veterinary Medicine* 122:257–264.
63. Roth, Z., Dvir, A., Kalo, D., Lavon, Y., Krifucks, O., Wolfenson, D. and Leitner, G. (2013). Naturally occurring mastitis disrupts developmental competence of bovine oocytes. *J. Dairy Sci.* 96,6499–6505.
64. Sakemi, Y., Tamura, Y. and Hagiwara, K. (2011). Interleukin-6 in quarter milk as a further prediction marker for bovine subclinical mastitis. *J Dairy Res.*78:118–21.
65. Santos, J. E. P., Cerri, R. L. A., Ballou, M. A., Higginbotham, G. E. and Kirk, J. H. (2004). Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. *Animal Reproduction Science.* 80,31–45.
66. Schrick, F. N., Hockett, M. E., Saxton, A. M., Lewis, M. J., Dowlen, H. H., and Oliver, S. P. (2001). Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. *J. Dairy Sci.* 84,1407–1412.
67. Schukken, Y.H., Hertl, J., Bar, D., Bennett, G.J., Gonzalez, R.N., Rauch, B.J., Santisteban, C., Schulte, H.F., Tauer, L., Welcome, F.L. and Grohn, Y.T. (2009). Effects of repeated gram-positive and gram-negative clinical mastitis episodes on milk yield loss in Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92, 3091–3105.
68. Schukken, Y. H., Gunther, J., Fitzpatrick, J., Fontaine, M. C., Goetze, L., Holst, O., Leigh, J., Petzl, W., Schuberth, H.-J., Sipka, A., Smith, D. G. E., Quesnell, R., Watts, J., Yancey, R., Zerbe, H., Gurjar, A., Zadoks, R. N. and

- Seyfert, H.-M. (2011). Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 144,270– 289.
69. Secretaría de Economía, Dirección General de Industrias Básicas. (SEDGIB). 2012. *Análisis Del Sector Lácteo En México*. 17p.
70. Skarzynski, D. J., Miyamoto, Y. and Okuda, K. (2000). Production of prostaglandin F 2a by cultured bovine endometrial cells in response to tumor necrosis factor α : cell type specificit and intracellular mechanisms. *Biol Reprod.* 62:1116–1120.
71. Soto, P., R. P. Natzke, and P. J. Hansen. (2003a). Actions of Tumor Necrosis Factor- α on Oocyte Maturation and Embryonic Development in Cattle. *American Journal of Reproductive Immunology.* 50: 380-388.
72. Soto, P., R. P. Natzke, and P. J. Hansen. (2003b). Identification of Possible Mediators of Embryonic Mortality Caused by Mastitis: Actions of Lipopolysaccharide, Prostaglandin F2a, and the Nitric Oxide Generator, Sodium Nitroprusside Dihydrate, on Oocyte Maturation and Embryonic Development in Cattle. *American Journal of Reproductive Immunology.* 50.263–272.
73. Spicer, J. L. (1998). Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) Inhibits Steroidogenesis of Bovine Ovarian Granulosa and Thecal Cells In Vitro. *Endocrine*, vol. 8, no. 2, 109–115.
74. Spicer, J. L. (2001). Receptors for insulin-like growth factor-I and tumor necrosis factor- α are hormonally regulated in bovine granulosa and thecal cells. *Animal Reproduction Science* 67:45–58

75. Stobel, D. P. y Moberg, G. P. (1982). Effect of adrenocorticotropin and cortisol on luteinizing hormone surge and estrous behavior of cows. *J Dairy Sci* 65:1016–1024.
76. Suzuki, C., Yoshioka, K., Iwamura, S. and Hirose H. (2001). Endotoxin induces delayed ovulation following endocrine aberration during the proestrous phase in Holstein heifers. *Domest Anim Endocrinol.* 20:267–278.
77. Tizard, I. (2009). *Inmunología veterinaria*. Edición 8. Editorial Elsevier. 592p.
78. Tortora, G. J. y Derrickson, B. H. (2011). *Principios de Anatomía y Fisiología* 11ª Edición. Editorial Panamericana. 713p.
79. Trigo, F. J. y Valero, G. (2004). *Patología General Veterinaria*. Cuarta Edición. UNAM. México DF. 437p.
80. Trinchieri, G. (1995). Interleukin- 12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.*13:251-276.
81. Usman, T., Wang, Y., Liu, C., He, Y., Wang, X. Dong, Y., Wu, H., Liu, A. and Yu, Y. (2017). Novel SNPs in IL-17F and IL-17A genes associated with somatic cell count in Chinese Holstein and Inner-Mongolia Sanhe cattle. *Journal of Animal Science and Biotechnology.* 8:5.
82. Uthaisangsook, S., Day, N. K., Bahna, S. L., Good, R. A. and Haraguchi, S. (2002). Innate immunity and its role against infections. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 88:253-264.

83. Verschoor, C. P., Pant, S. D., Schenkel, F. S., Sharma, B. S. and Karrow, N. A. (2009). SNPs in the bovine IL-10 receptor are associated with somatic cell score in Canadian dairy bulls. *Mamm Genome* 20:447–454.
84. Waller, K. P., Colditz, I. G., and Ostensson. K. (2003). Cytokines in mammary lymph and milk during endotoxin-induced bovine mastitis. *Res Vet Sci.* 74:31–36.
85. Wilson, D. J., Grohn, Y. T., Bennett, G. J., González, R. N., Schukken, Y. H., and Spatz J. (2008). Milk Production Change Following Clinical Mastitis and Reproductive Performance Compared Among J5 Vaccinated and Control Dairy Cattle *J. Dairy Sci.* 91:3869–3879.