

Reducción del estrés por calor durante el período seco: ¿Mejora el enfriamiento la transición hacia la lactancia?

B. C. do Amaral,* E. E. Connor, † S. Tao,* J. Hayen,* J. Bubolz,* y G. E. Dahl*¹

*Department of Animal Sciences, University of Florida, Gainesville 32611

†Bovine Functional Genomics Laboratory, USDA-ARS, Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, MD 20705

RESUMEN

Los factores ambientales, especialmente la temperatura y la exposición a la luz, influyen en la salud y productividad de las vacas lecheras durante la lactancia, posiblemente mediante mecanismos fisiológicos similares. Por ejemplo, el estrés por calor es un componente crítico del rendimiento de leche disminuido durante el verano. Sin embargo, se sabe menos sobre el efecto del estrés por calor durante el período seco. El objetivo del presente estudio fue evaluar los efectos del estrés por calor preparición bajo un fotoperíodo controlado sobre el desempeño en la lactancia y la expresión genética metabólica hepática de vacas Holstein multiparas periparturientas ($n = 16$). Las vacas se secaron aproximadamente 46 días antes de la fecha de parición esperada y se les asignó un tratamiento aleatoriamente luego de bloquearlas por producción de leche equivalente madura y parición. Los tratamientos consistieron o en estrés por calor (HT) o enfriamiento (CL) con ventiladores y rociadores, ambos bajo un fotoperíodo de 14L:10D. Se midió la temperatura rectal dos veces por día durante el período seco. Luego de la parición, se alojó a las vacas en un establo de estabulación libre con dispositivos de enfriamiento, y se registró el rendimiento de leche diario hasta los 210 días en leche. Se extrajeron muestras de sangre desde el secado hasta los +42 días con relación a la parición en busca de metabolitos y desde los -2 hasta +2 días con relación a la parición para análisis hormonales. La ingesta de materia seca se midió desde los -35 hasta los +42 días con relación a la parición. Se recolectaron biopsias hepáticas al momento del secado, a los -20, +2, y +20 días con relación a la parición para las vacas expuestas a HT ($n = 5$) y CL ($n = 4$) para medir la expresión de ARNm de los supresores de la señalización de citocinas-2 (SOCS-2), proteína 5 ligadora del factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP-5), un factor de transcripción clave en la biosíntesis lipídica (SREBP-1c), y las enzimas del metabolismo lipídico (FASN, ACACA y ACADVL) mediante PCR cuantitativo en tiempo real. El estrés por calor incrementó las temperaturas rectales (39,2 vs. 38,8°C), las concentraciones de prolactina en plasma a los -1 (171 vs. 79 ng/mL) y 0 días (210 vs. 115 ng/mL) con relación a la parición, y disminuyó la ingesta de materia seca a los 0 y +14 días con relación a la parición y la leche corregida en grasa al 3,5% postparición

(26,1 vs. 35,4 kg/d) en comparación con las vacas expuestas a CL. Con relación a las vacas expuestas a CL, la expresión del ARNm hepático de la SOCS-2 y IGFBP-5 se reguló hacia abajo en las vacas expuestas a HT. La expresión de la ACADVL se reguló hacia arriba en las vacas expuestas a CL a los +2 días, pero se reguló hacia abajo a los +20 días en relación a las vacas expuestas a HT. Las concentraciones de C16:0 y C18:1 *cis* fueron mayores en la leche e hígado de las vacas expuestas a CL en comparación con las vacas expuestas a HT, lo que refleja una mayor movilización lipídica. Estos resultados sugieren que la reducción del estrés por calor en el período seco mejora la lactancia subsiguiente, posiblemente mediante la supresión del pico de prolactina en plasma alrededor de la parición, la expresión de las SOCS-2 y la regulación del metabolismo lipídico hepático.

Palabras clave: ganado lechero, período seco, estrés por calor, expresión genética

INTRODUCCIÓN

Los factores ambientales, especialmente la temperatura y el fotoperíodo, influyen en la salud y productividad del ganado lechero durante la lactancia, posiblemente mediante mecanismos fisiológicos similares. El estrés por calor durante la lactancia representa el 10 al 25% de la pérdida de producción de leche (Collier *et al.*, 2006). La exposición de las vacas a enfriamiento durante el período seco incrementa la producción de leche con relación a los animales expuestos a estrés por calor (Avendaño-Reyes *et al.*, 2006) según lo informado por Collier *et al.* (1982b), pero los mecanismos siguen sin resultar claros.

El fotoperíodo de día largo durante la lactancia también mejora el rendimiento de leche, mientras que el fotoperíodo de día corto durante el período seco mejora la salud y el consiguiente desempeño en la lactancia (Dahl, 2008). El efecto fotoperiódico observado en las vacas secas es mediado a través de la señalización de la prolactina (PRL) (Schams y Reinhardt, 1974; Auchtung *et al.*, 2005; Wall *et al.*, 2005b), que afecta la diferenciación y crecimiento de las células mamarias (Wall *et al.*, 2005a), la función inmune (Auchtung *et al.*, 2004), el eje IGF, y el desempeño de la lactancia (Dahl, 2008). De interés: las temperaturas altas incrementan la PRL circulante (Collier *et al.*, 1982a, 2008). Por lo tanto, la PRL podría brindar un mecanismo endócrino consistente para iniciar los efectos del fotoperíodo y el estrés por calor sobre la productividad y salud de las vacas lecheras.

Además, existe evidencia para respaldar un vínculo entre la señalización de la PRL y el metabolismo lipídico hepático

Recibido 1 de mayo de 2009.

Aceptado 4 de septiembre de 2009.

¹Enviar correspondencia al autor: gdahl@ufl.edu

(Dahl, 2008). La exposición de los novillos en crecimiento a un fotoperíodo de día corto durante 6 semanas redujo la expresión del ARNm hepático de la acetil-CoA carboxilasa (**ACACA**) y de la acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga (**ACADVL**) (Connor *et al.*, 2007). Savage *et al.* (2006) demostraron que bloquear la **ACACA** incrementa la oxidación de las grasas, inhibe la lipogénesis y reduce la concentración de malonil-CoA en el hígado de rata. Loo *et al.* (2005) informaron una asociación positiva entre el ARNm de la **ACADVL** y las concentraciones incrementadas de NEFA circulantes y triacilglicerol hepático, que son signos característicos del hígado graso en las vacas lecheras. Por lo tanto, una reducción en la expresión del ARNm de la **ACACA** y **ACADVL** podría representar menor movilización de grasas, lo que debería ser deseable en la vaca en transición.

Debido a que los días largos incrementan la PRL y a que la PRL aumentada durante el período seco se asocia con un desempeño deprimido en la siguiente lactancia, podría dar como resultado una respuesta similar a partir de los incrementos en la PRL inducidos por el estrés por calor en vacas secas. Sin embargo, no se ha investigado el efecto del estrés por calor bajo un fotoperíodo controlado durante el período seco. Además, se desconoce el efecto del estrés por calor durante el final de la preñez sobre el metabolismo lipídico hepático pero podría representar un factor importante en el desempeño subsiguiente. Los objetivos del estudio actual eran evaluar los efectos del estrés por calor bajo un fotoperíodo controlado durante el período seco en la expresión genética metabólica hepática y el desempeño subsiguiente en la lactancia de las vacas lecheras periparturientas. La hipótesis era que el enfriamiento de las vacas secas bajo un fotoperíodo controlado optimizaría el desempeño subsiguiente con relación a las vacas estresadas por el calor y que los efectos del enfriamiento serían mediados por cambios en la expresión genética del metabolismo hepático y la supresión de la PRL circulante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales, tratamientos y muestreo

El experimento se condujo en la Unidad de Investigación Lechera de la Universidad de Florida en Hague, Florida. Todos los animales experimentales se manejaron de acuerdo con las pautas aprobadas por el Comité de Investigación Animal del Instituto de Ciencias Alimentarias y Agrícolas de la Universidad de Florida. Las vacas Holstein multíparas se secaron 46 días antes de la parición esperada de acuerdo al protocolo estándar de la Unidad de Investigación Lechera de la Universidad de Florida, que consiste en la cesación del ordeño y la infusión intramamaria de cada cuarto con antibiótico (Quartermaster, Pfizer, Kalamazoo, MI). Las vacas se asignaron de forma aleatoria al tratamiento después del bloqueo por producción de leche equivalente madura y pariciones. Se impusieron los tratamientos solamente durante el período seco e incluyeron estrés por calor (**HT**; n = 9) o enfriamiento (**CL**; n = 7).

El sistema de enfriamiento consistió en ventiladores (J&D Manufacturing, Eau Claire, WI) y rociadores (Rainbird Manufacturing, Glendale, CA) que se encendían automáticamente cada vez que la temperatura ambiente superaba los 21,1°C. Los tratamientos comenzaron al momento del secado (desde el 20 de agosto al 17 de septiembre de 2007) y prosiguieron hasta la parición (21 de septiembre al 3 de noviembre de 2007). Ambos tratamientos tuvieron un fotoperíodo de 14L:10D provisto por lámparas de haluro metálico a aproximadamente 250 lx a nivel de los ojos de la vaca, aproximadamente 3 m por encima del suelo del establo. Para ambos tratamientos, las luces se encendían a las 0600 h y se apagaban a las 2000 h. La temperatura rectal se midió dos veces por día durante el período seco entero. Las vacas en parto se alojaron en establos de estabulación libre con camas de arena y se alimentaron de forma individual mediante la utilización del sistema de puertas Calan (American Calan Inc., Northwood, NH). Cuando se detectaron signos de parición, se movieron las vacas al corral adyacente con cama de arena con sombra y agua. Después de parir, todas las vacas se alojaron juntas en un establo de estabulación libre, con cama de arena equipado con ventiladores, rociadores y sistema de puertas Calan. Se registró a diario el rendimiento de leche hasta los 210 DIM postparición. Se midió la DMI (ingesta de materia seca) diaria desde el secado hasta los +42 días con relación a la parición. Las vacas secas se alimentaron con TMR (ración mezclada total) una vez por día a las 0930 h, mientras que las vacas en ordeño se alimentaron con TMR dos veces por día a las 0900 y a las 1300 h para permitir rechazos de alimentación del 5 al 10% diarios. Se recogió una muestra de ensilado de maíz semanal y se la secaba inmediatamente durante 1 hora usando un secador eléctrico (Koster Crop Tester Inc., Strongsville, OH) para calcular el porcentaje de DM para mantener la relación forraje a concentrado formulada en la ración. Las vacas se ordeñaron dos veces por día a las 0900 y a las 2100 h. Se pesaban las vacas y se registraba el puntaje de la condición corporal (Edmonson *et al.*, 1989) a los -46, -32, -18, 0, +14, +28 y +42 días con relación a la parición antes de alimentarlas durante el período seco y después del ordeño de las 0900 h y antes de alimentarlas durante el período de lactancia.

Recolección de muestras

Se recolectaron muestras de leche semanalmente de dos ordeños consecutivos, y se usó bronopol-B-14 como conservante. Southeast Milk Inc. (Bellevue, FL) midió la leche en cuanto a grasa, proteína verdadera y SCC (conteo de células somáticas) mediante la utilización de un analizador NIR Bentley 2000 (Bentley Instruments, Chaska, MN). Se calcularon las concentraciones finales de los componentes después del ajuste para obtener la producción de leche durante dichos ordeños. La leche sin conservantes se recolectó en dos ordeños consecutivos a los +35 y +42 días con relación a la parición, se acumuló en base al rendimiento de leche (volumen final de 45 mL), y se congeló hasta el análisis de los ácidos grasos. Se recolectó sangre (10 mL) a las 0700 h a los -46, -32, -18, 0, +14, +28 y +42 días con relación a la fecha de parición esperada a partir de vasos coxígeos dentro de tubos heparinizados con sodio (Vacutainer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) para el análisis de metabolitos. Además, se extrajeron muestras de sangre

Tabla 1. Composición de ingredientes y química del alimento de las TMR dadas a vacas Holstein durante los períodos preparación y postpartición

Ítem	Preparación	Postpartición
Ingrediente, % de DM (Materia seca)		
Ensilado de maíz	30,0	39,5
Pasto Bermudas	34,7	—
Heno de alfalfa	—	12,5
Maíz molido	12,0	17,4
Alimento con gluten de maíz	—	6,6
Pulpa cítrica	10,2	5,2
Alimento de poroto de soja	6,7	6,3
Soyplus ¹	—	8,8
Sal mineralizada con oligoelementos ²	0,1	—
Premezcla de minerales y vitaminas, preparación ³	6,3	—
Premezcla de minerales y vitaminas, postpartición ⁴	—	3,7
Composición química		
NE _L , Mcal/kg de DM	1,52	1,63
CP, % de DM	14,6	17,1
NDF, % de DM	40,2	32,9
ADF, % de DM	24,9	20,9
Extracto de éter, % de DM	3,4	3,9
Ca, % de DM	1,80	0,75
P, % de DM	0,33	0,42
Mg, % de DM	0,33	0,34
K, % de DM	1,41	1,60
Na, % de DM	0,19	0,28
S, % de DM	0,42	0,23
Cl, % de DM	0,76	0,44
Fe, mg/kg de DM	328	252
Zn, mg/kg de DM	50	65
Cu, mg/kg de DM	19	24
Mn, mg/kg de DM	40	42
Mo, mg/kg de DM	1,1	1,2

¹West Central Soy, Ralston, IA.²La sal mineralizada con oligoelementos contenía concentraciones mínimas de 40% Na, 55% Cl, 0,25% Mn, 0,2% Fe, 0,033% Cu, 0,007% I, 0,005% Zn y 0,0025% Co (base de la DM).³La premezcla de minerales y vitaminas contenía 22,8% CP, 22,9% Ca, 0,20% P, 0,2% K, 2,8% Mg, 0,7% Na, 2,4% S, 8% Cl, 147 mg/kg de Mn, 27 mg/kg de Fe, 112 mg/kg de Cu, 95 mg/kg de Zn, 7 mg/kg de Se, 8 mg/kg de I, 11 mg/kg de Co, 268.130 IU de vitamina A/kg, 40.000 IU de vitamina D/kg, y 1.129 IU de vitamina E/kg (base de la DM).⁴La mezcla de minerales y vitaminas contenía 26,4% CP, 10,2% Ca, 0,90% P, 3,1% Mg, 1,5% S, 5,1% K, 8,6% Na, 1.500 mg/kg de Zn, 512 mg/kg de Cu, 339 mg/kg de Fe, 2.231 mg/kg de Mn, 31 mg/kg de Co, 26 mg/kg de I, 7,9 mg/kg de Se, 147.756 IU de vitamina A/kg, y 787 IU de vitamina E/kg (base DM).

dos veces al día desde los -2 hasta los +2 días con relación a la parición para el análisis de la PRL. Las muestras se colocaron inmediatamente sobre hielo hasta que se las centrifugó a $2.619 \times g$ a 5°C durante 30 min. Se separó el plasma y se lo congeló a -20°C para análisis subsiguientes. A los -46, -20, +2 y +20 días con relación a la parición, se recogieron muestras del hígado (aproximadamente 400 mg) mediante biopsia, se las enjuagó con solución salina estéril, se las congeló inmediatamente en N líquido, y se las almacenó a -80°C hasta el análisis en busca de abundancia de ácidos grasos y ARNm.

Se recolectaron muestras representativas de ensilado de maíz, heno de pasto Bermuda, heno de alfalfa y mezclas concentradas semanalmente. Las muestras semanales se compusieron mensualmente y se molieron utilizando un molino Wiley de malla de 1 mm (A. H. Thomas, Philadelphia, PA). Se analizaron las muestras de alimento (ensilado de maíz, heno de pasto Bermuda, heno de alfalfa y mezclas concentradas) en busca de minerales y de la composición grasa, NDF, ADF, y CP (Dairy One, Ithaca, NY; Tabla 1).

Procedimientos analíticos

Las concentraciones de PRL en plasma se determinaron en muestras tomadas dos veces por día desde los -2 hasta los +2 días con relación a la parición (do Amaral *et al.*, 2009). Las concentraciones de NEFA (NEFA-C Kit, Wako Fine Chemical Industries USA Inc., Dallas, TX; según lo modificaron Johnson y Peters, 1993) y BHBA (Autokit 3-HB, Wako Fine Chemical Industries USA Inc.) en plasma se determinaron en base a muestras desde el secado hasta los +42 días postpartición. Bajo un programa similar, se utilizó un autoanalizador Technicon (Technicon Instruments Corp., Chauncey, NY) para determinar las concentraciones de BUN en plasma (una modificación de Coulombe y Favreau, 1963, y Marsh *et al.*, 1965) y glucosa en plasma (una modificación de Gochman y Schmitz, 1972).

Se aisló la grasa de la leche mediante centrifugado de la leche descongelada a $17.800 \times g$ durante 30 min a 8°C. Se extrajo aproximadamente 325 mg de grasa aislada manualmente usando una mezcla de solventes 3:2 (vol/vol) de hexano/isopropanol (18 mL/g de grasa). La grasa extraída se convirtió en esteres metílicos de acuerdo a Chouinard *et al.* (1999) y posteriormente se analizó en busca de ácidos grasos. La extracción de grasa y la metilación de muestras del hígado se realizó de acuerdo a Kramer *et al.* (1997). Los esteres metílicos de los ácidos grasos de la leche y las muestras del hígado se determinaron mediante la utilización de un cromatógrafo de gases Varian CP-3800 (Varian Inc., Palo Alto, CA) equipado con muestreador automático (Varian CP-8400), detector de ionización de llama y una columna capilar Varian (CP-Sil 88; 100 m $\times$ 0,25 mm $\times$ 0,2 μ m). El gas portador fue helio, la relación de división fue 10:1 y las temperaturas del inyector y del detector se mantuvieron a 230 y 250°C, respectivamente. Se inyectó un microlitro de muestra mediante el muestreador automático dentro de la columna. La temperatura del horno se fijó inicialmente en 120°C durante 1 min, se la incrementó de a 5°C/min hasta los 190°C, se la mantuvo a 190°C durante 30 min, se incrementó 2°C/min hasta los 220°C, y se la mantuvo a 220°C durante 40 min. El pico se identificó y calculó en base al tiempo de retención y al área del pico de los estándares conocidos.

Aislación de ARN total y PCR cuantitativo

El ARN total se extrajo del hígado usando el método recomendado de aislamiento de ARN de tejidos grasos animales (Qiagen Inc., Valencia, CA). Resumiendo, se homogenizaron los tejidos del hígado en reactivo Qiazol (Qiagen Inc.), seguido por extracción de cloroformo y agregado de un volumen igual de etanol al 70% (vol/vol) a la fase acuosa. El ARN total luego se aisló utilizando el Mini Kit RNeasy

Tabla 2. Secuencias iniciadoras, temperatura de anillamiento y tamaño de amplicon de cada objetivo genético analizado en el hígado bovino mediante PCR cuantitativo en tiempo real

Gen ¹	Secuencia	Iniciadora (5'→3')	Tamaño, bp	Temperatura, °C
ACACA	Hacia adelante	CCTGGTTGCACAAAAGGATT	176	56,8
	Reversa	TTCTCATCCGGTTCAGCTCT		
ACADVL	Hacia adelante	CACCATGAAAGGCATCATTG	160	56,8
	Reversa	GTTGGCACTCACCATGTACG		
FASN	Hacia adelante	TCATCCCCCTGATGAAGAAG	361	56,8
	Reversa	AACTCCACAGGTGGGAACAG		
IGFBP-5	Hacia adelante	AAAGAAGCTGACCCAGTCCA	100	60,0
	Reversa	CCCCTGCTCAGATTTCTGTC		
SOCS-2	Hacia adelante	GGGATGCTTCCCTTCCTAAG	145	60,0
	Reversa	GTGCTGGGACCTTTCACCTA		
SREBP-1c	Hacia adelante	CCGAGGCCAAGTTGAATAAA	136	56,8
	Reversa	TTCAGCGATTGCTTTTGTG		

1ACACA = acetil-CoA carboxilasa; ACADVL = acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga; FASN = ácido graso sintasa; IGFBP-5 = proteína 5 ligadora del factor de crecimiento similar a la insulina; SOCS-2 = supresores de la señalización de citocinas-2; SREBP-1c = proteína-1c ligadora del elemento regulador del esteroide.

y digestión de Nase con columna (Qiagen Inc.). La calidad del ARN se determinó mediante la utilización del Bioanalizador Agilent 2100 con Kits RNA 6000 Nano LabChip (Agilent Technologies, Palo Alto, CA), y la concentración de ARN se determinó mediante la utilización de un espectrómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Rockland, DE). Se utilizó el kit de síntesis iScript cDNA (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) para la síntesis de ADNc de primera cadena mediante la utilización de 2 µg de ARN total por cada 80-µL de volumen de reacción. Se realizó una reacción de control negativo en paralelo en ausencia de la enzima transcriptasa inversa. Las condiciones de la reacción fueron 25°C durante 5 min, 42°C durante 30 min y 85°C durante 5 min.

La abundancia de transcripción para cada gen se determinó mediante PCR en tiempo real cuantitativo absoluto mediante la utilización del Sistema de Detección de PCR en tiempo real Bio-Rad iCycler o MyiQ (Bio-Rad Laboratories). Las reacciones se realizaron en duplicado utilizando 2 µL de ADNc, 0.4 µmol de cada iniciadora, y 12.5 µL de Supermezcla verde iQ SYBR (Bio-Rad Laboratories) en un volumen de reacción de 25-µL. Las condiciones de ciclado de la reacción fueron 95°C durante 3 min seguidas por 45 ciclos a 94°C durante 15 s, temperatura de anillado durante 30 s, y 72°C durante 30 s con una medición de fluorescencia durante la etapa de extensión. La Tabla 2 resume las secuencias de la iniciadora, temperatura de anillado, y tamaño del amplicon de cada objetivo genético. La identidad de los productos de la amplificación se confirmó mediante secuenciamiento directo de los productos de amplificación de PCR purificados con gel (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen Inc.) utilizando un secuenciador de ADN automatizado CEQ8000 y un DTCS Quickstart Chemistry (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Las concentraciones de amplicons se determinaron mediante la utilización del espectrómetro NanoDrop ND-1000 y se usaron para crear curvas de calibración para cada gen. Se analizaron patrones que variaban desde 10² a 10⁷ moléculas en duplicado con cada ensayo. Se realizó una única reacción de control negativo para cada muestra experimental, y se incluyó una única reacción en blanco utilizando agua como control con cada curva estándar.

Las cantidades de transcripciones en cada muestra se determinaron automáticamente mediante interpolación desde la curva estándar por medio del software iQ o MyiQ. La abundancia final de transcripciones se expresó como la cantidad final de moléculas por unidad de ARN total usadas en la reacción de transcripción inversa.

Análisis estadístico

Las mediciones de las DMI diarias durante los períodos pre y postparto, producción de leche y composición de la leche se redujeron a medias semanales antes de que se realizaran los análisis estadísticos. Los ácidos grasos de la leche, longitud del período seco y BW (peso corporal) del ternero se analizaron utilizando PROC GLM de SAS (SAS Institute, Cary, NC). Los datos de mediciones repetidas (DMI, producción de leche, grasa en leche, proteínas en leche, BW, BCS (puntaje de condición corporal), PRL en plasma, NEFA, BUN, glucosa en plasma y ácidos grasos del hígado) se analizaron mediante la utilización de los procedimientos PROC MIXED de SAS. El modelo incluía el efecto fijo del tratamiento, tiempo y tratamiento por interacción del tiempo y el efecto aleatorio de la vaca. Se evaluaron los datos para determinar la estructura de ajuste óptimo, es decir AR(1), ARH(1), CS, o CSH, según lo indicado por un valor de criterio de información Schwartz Bayesian más bajo (Littell *et al.*, 1996). Se informa el error estándar de la media.

RESULTADOS

Temperatura rectal, temperatura del establo y humedad relativa

Como se esperaba, la temperatura rectal durante el período vespertino fue superior para las vacas expuestas a HT en comparación con las vacas expuestas a CL (39,2 vs. 38,8°C, SEM = 0,1°C; *P* = 0,05). Sin embargo, la temperatura rectal en el período matutino no fue diferente entre los tratamientos (38,7 vs. 38,6°C, SEM = 0,1°C; *P* = 0,35). Además, la temperatura del establo y

la humedad relativa durante el día no difirieron entre los tratamientos ($P = 0,94$ y $P = 0,74$ para la temperatura del establo y humedad relativa, respectivamente; Figura 1).

Longitud del período seco y peso del ternero

Las vacas expuestas a HT tendieron a tener un período seco 7 días más corto que aquellas expuestas a CL (38 vs. 45 días, respectivamente, SEM = 3 d; $P = 0,12$). El BW del ternero fue 13 kg más liviano para los terneros nacidos de vacas expuestas a HT a comparación de aquellos nacidos de vacas expuestas a CL (31 vs. 44 kg, SEM = 2 kg; $P < 0,001$).

Producción de leche, composición de la leche y DMI

Las vacas expuestas a CL durante el período seco produjeron en promedio 7,5 kg/d más leche que las vacas expuestas a HT (Tabla 3; $P = 0,01$). La producción de leche ajustada para los componentes (FCM en 3,5%, leche corregida en grasa y proteínas en 3,5% y ECM) a lo largo del período postpartición de 30 semanas (Tabla 3 y Figura 2) fue mayor para las vacas expuestas a CL en comparación con las vacas expuestas a HT. Las vacas expuestas a CL tuvieron mayor concentración ($P = 0,07$) y rendimiento ($P = 0,1$) de grasa en leche a comparación con las vacas expuestas a HT. No hubo diferencia en los tratamientos en el porcentaje de proteínas en la leche ($P = 0,62$; Tabla 3). Sin embargo, el rendimiento de las proteínas tendió a ser mayor ($P = 0,09$) a partir de las vacas expuestas a CL que de las vacas expuestas a HT (Tabla 3). Las vacas expuestas a CL tuvieron mayor eficiencia del alimento ($P = 0,06$) durante los primeros 42 días postpartición en comparación con las vacas expuestas a HT.

Las vacas expuestas a HT durante el período seco tuvieron DMI similares (como % del BW; Figura 3) en comparación con las expuestas a

CL desde el secado hasta los -14 días con relación a la parición. A medida que se aproximaba la parición, sin embargo, disminuyó la DMI en las vacas expuestas a CL (como % del BW) en aproximadamente el 50% por día de parición, y las vacas expuestas a CL todavía tuvieron menos ingesta a los +14 días con relación a las vacas expuestas a HT (Figura 3; $P = 0,03$).

Prolactina y metabolitos

Las vacas expuestas a HT tuvieron una mayor concentración de PRL en plasma a los -1 (171 vs. 79 ng/mL, SEM = 28 ng/mL; $P = 0,03$; Figura 4) y 0 días (210 vs. 115 ng/mL, SEM = 24 ng/mL; $P = 0,01$; Figura 4) con relación a la parición.

Las vacas expuestas a CL tuvieron una mayor concentración de NEFA en plasma alrededor de la parición en comparación con las vacas expuestas a HT (Figura 5). La concentración de BHBA se incrementó en las vacas expuestas a CL a los +14 y +28 días postpartición (Figura 5). La concentración de glucosa en plasma (71 vs. 71 mg/dL, SEM = 1 mg/dL; $P = 0,88$) y BUN (11,2 vs. 11,3 mg/dL, SEM = 0,50 mg/dL; $P = 0,92$) no difirió entre los tratamientos.

Expresión genética hepática

La expresión en el ARNm de la proteína 1c ligadora del elemento regulador del esteroide (**SREBP-1c**; 96 vs. 79% del valor de referencia para las vacas expuestas a HT y CL, respectivamente, SEM = 15%; $P = 0,56$), **ACACA** (97 vs. 92% del valor de referencia para las vacas expuestas a HT y CL, respectivamente, SEM = 22%; $P = 0,88$), ácido graso sintasa (**FASN**; 136 vs. 97% del valor de referencia para las vacas expuestas a HT y CL, respectivamente, SEM = 28%; $P = 0,33$) no difirió entre los tratamientos.

La expresión del ARNm de la **ACADVL** en el hígado de las vacas expuestas a CL se reguló hacia arriba a los +2 días con relación a la parición en comparación con las vacas expuestas a HT (interacción del tratamiento por día; $P < 0,01$; Tabla 4). Sin embargo, a los +20 días con relación a la parición, la expresión del ARNm de la **ACADVL** se reguló hacia abajo para las vacas expuestas a CL en comparación con las vacas expuestas a HT. Con relación a las vacas expuestas a HT, las vacas expuestas a CL habían regulado hacia arriba la expresión del ARNm hepático del supresor de la señalización de citocinas 2 (**SOCS-2**; Tabla 4) y la proteína 5 ligadora del factor de crecimiento similar a la insulina (**IGFBP-5**; Tabla 4).

Perfiles de ácidos grasos en la leche y el hígado

Las vacas expuestas a CL tuvieron menores concentraciones de C8:0, C10:0, C12:0, C14:0 y C15:0 en la leche en comparación con las vacas expuestas a HT (Tabla 5; $P \leq 0,05$). El perfil de los ácidos grasos reflejó menores concentraciones de síntesis de novo de ácidos grasos en la glándula mamaria de las vacas expuestas a CL en relación a las vacas expuestas a HT (Tabla 5; $P = 0,02$).

Las vacas expuestas a CL tuvieron una mayor concentración de C18:1 *cis*-9 en la leche a comparación de las vacas expuestas a HT (Tabla 5; $P = 0,03$). Las concentraciones de ácidos grasos monoinsaturados

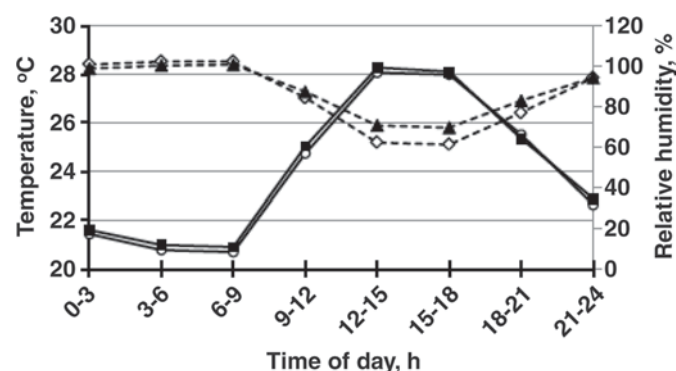


Figura 1. Temperaturas del establo y humedad relativa durante el período seco. La línea sólida con cuadrados sólidos (■) representa la temperatura del establo expuesto a tratamiento de enfriamiento (CL), y la línea sólida con círculos abiertos (○) representa la temperatura del establo expuesto a tratamiento de estrés por calor (HT). La línea discontinua con triángulos sólidos (▲) representa la humedad relativa del establo expuesto a CL, y la línea discontinua con triángulos abiertos (◊) representa la humedad relativa del establo expuesto a HT. El eje x representa un promedio de 8 puntos de tiempo durante el día (intervalos de 3 h). La temperatura y humedad relativa en el establo no difirieron entre los tratamientos ($P = 0,94$ y $P = 0,74$ para temperatura y humedad relativa del establo, respectivamente).

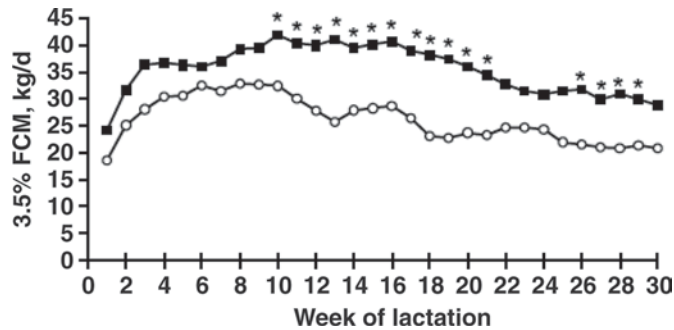


Figura 2. Efecto del enfriamiento (CL; $n = 7$) o estrés por calor (HT; $n = 9$) durante un período seco de 46 días en la producción de leche durante la lactancia subsiguiente. Los cuadrados sólidos ($\blacksquare$) representan a las vacas expuestas a CL, y los círculos abiertos (O) representan a las vacas bajo HT. Las vacas expuestas a CL tuvieron mayor producción de leche que las vacas expuestas a HT durante las primeras 30 semanas de lactancia. * $P < 0,05$; SEM = 2,3 kg/d. Después de la parición, las vacas se alojaron juntas en el mismo establo equipado con ventiladores y rociadores.

en la grasa de la leche fueron mayores para las vacas expuestas a CL con relación a aquellas para las vacas expuestas a HT (Tabla 5; $P = 0,03$), principalmente debido a la mayor movilización del C18:1 *cis*-9 desde el tejido adiposo de las vacas expuestas a CL (Tabla 5; $P = 0,03$). Debido al cambio en los ácidos grasos monoinsaturados, los ácidos grasos poliinsaturados fueron menos en la grasa de la leche de las vacas expuestas a CL en comparación con el tratamiento de HT (Tabla 5; $P = 0,01$) principalmente debido a una disminución en el ácido linoleico conjugado *cis*-9, *trans*-11 (0,51 vs. 0,63%), C18:3 (0,28 vs. 0,33%), y C20:4 (0,19 vs. 0,23%).

De manera similar al perfil del ácido graso de la leche, la concentración de C18:1 *cis*-9 fue mayor ($P < 0,01$) y el C16:0 tendió ($P = 0,09$; Tabla 6)

a ser mayor a los +2 días con relación a la parición en el tejido hepático de las vacas expuestas a CL en comparación con las vacas expuestas a HT. La concentración de ácidos grasos monoinsaturados en el hígado de las vacas expuestas a CL fue mayor, mientras que la concentración de ácidos grasos poliinsaturados fue menor, a los +2 días con relación a la parición en comparación con las vacas expuestas a HT ($P < 0,01$; Tabla 6).

DEBATE

Probar la hipótesis de que el enfriamiento de las vacas secas bajo un fotoperíodo controlado mejoraría el metabolismo hepático y el desempeño subsiguiente en la lactancia requería confirmación de que se había logrado la reducción del estrés por calor. Como se esperaba, las temperaturas rectales de las vacas expuestas a HT fueron superiores a aquellas de las vacas expuestas a CL, lo que indica que el sistema de refrigeración (ventiladores y rociadores) fue eficaz en la reducción de la temperatura del animal a pesar de la temperatura y humedad relativa similares de los establos. De manera similar, Avendaño-Reyes *et al.* (2006) informaron que las vacas refrigeradas con agua pulverizada y ventiladores tenían temperaturas rectales y ritmo respiratorios menores que las vacas estresadas por calor. El menor BW de los terneros de las vacas expuestas a HT es una prueba adicional del estrés por calor durante el período seco, como lo es el incremento en la PRL circulante (Collier *et al.*, 1982a; Wolfenson *et al.*, 1988; do Amaral *et al.*, 2009). Por lo tanto, nuestro modelo fue adecuado para la identificación de los mecanismos hepáticos que respaldan los efectos subsiguientes del enfriamiento en el período seco sobre el rendimiento de la leche.

Tabla 3. Rendimiento de leche, Rendimiento de FCM (leche corregida en grasa) al 3,5%, Rendimiento de FPCM (leche corregida en grasa y proteínas) al 3,5%, Rendimiento de ECM (Leche corregida por energía), componentes de la leche, y eficiencia del alimento para las vacas expuestas a estrés por calor (HT; $n = 9$) o enfriamiento (CL; $n = 7$) durante un período seco esperado de 46 días

Variable	HT	CL	SEM	Valor P
Rendimiento de leche, kg/d	26,2	33,7*	2,3	0,04
3,5% FCM, ¹ kg/d	26,1	35,4**	2,3	0,01
3,5% FPCM, ² kg/d	26,0	34,5*	2,3	0,02
ECM, ³ kg/d	26,3	34,9*	2,3	0,02
Grasa, %	3,5	3,9	0,1	0,07
Proteína, %	3,2	3,0	0,1	0,62
Rendimiento de grasa, kg/d	0,9	1,3**	0,1	0,01
Rendimiento de proteína, kg/d	0,8	1,0	0,1	0,09
Eficiencia del alimento ⁴	1,4	2,0	0,2	0,06
BW, ⁵ kg	633	698**	16	0,01
BCS ⁵	3,0	3,6**	0,1	0,01
DMI, kg/d				
Preparición, día -46 a -1	12,0	14,1***	0,4	0,001
Postpartición, día 0 a 42	19,3	17,7	1,3	0,36

¹3,5% FCM = $(0,4324 \times \text{rendimiento de leche}) + (16,216 \times \text{rendimiento de la grasa de la leche})$.

²3,5% leche corregida en grasa y proteínas (FPCM) = $(12,82 \times \text{kg de grasa}) + (7,13 \times \text{kg de proteína}) + (0,323 \times \text{kg de leche})$.

³ECM = $(0,327 \times \text{kg de leche}) + (12,95 \times \text{kg de grasa}) + (7,20 \times \text{kg de proteína})$ (Tyrrell and Reid, 1965).

⁴Eficiencia del alimento = kg de 3,5% FCM/kg de DMI. La eficiencia se calculó a diario desde la parición hasta los +42 días con relación a la parición.

⁵El BW y el BCS se midieron a los -46, -32, -18 y 0 días con relación a la fecha esperada de parición.

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

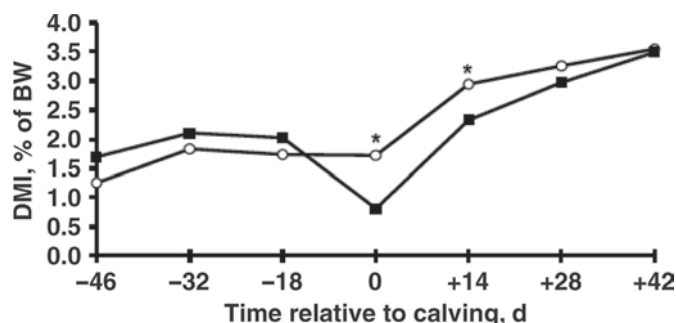


Figura 3. Efecto del enfriamiento (CL; $n = 7$) o estrés por calor (HT; $n = 9$) durante un período seco de 46 días sobre la DMI como un porcentaje del BW antes y después de la parición. Los cuadrados sólidos (■) representan a las vacas expuestas a CL, y los círculos abiertos (○) representan a las vacas expuestas a HT. No hubo diferencia entre los grupos en la DMI durante el período seco ($P = 0.54$). *Durante los +14 días iniciales de lactancia, las vacas expuestas a CL tuvieron menor DMI (% de BW) en relación a aquellas expuestas a HT (tratamiento por interacción por semana; $P < 0.05$). Después de la parición, las vacas se alojaron juntas en el mismo establo equipado con ventiladores y rociadores.

Los resultados del estudio actual confirman que la exposición de las vacas a CL durante el período seco incrementa la producción de leche con relación a los animales expuestos a HT, como se observó anteriormente (Wolfenson *et al.*, 1988; Avendaño-Reyes *et al.*, 2006; Urdaz *et al.*, 2006). La concentración de grasa en leche y el rendimiento fueron mayores para las vacas expuestas a CL en comparación con las vacas expuestas a HT. De manera similar, Avendaño-Reyes *et al.* (2006) informaron un incremento en el rendimiento de la grasa de la leche en la lactancia subsiguiente con vacas que se enfriaron previamente en comparación con vacas que estuvieron bajo estrés por calor. Debe enfatizarse, sin embargo, que hubo diferencias en la duración e intensidad del enfriamiento entre los estudios anteriores y el experimento actual. Por ejemplo, Collier *et al.* (1982b) brindaron solo sombra como reducción para el estrés por calor, mientras que las vacas expuestas a HT en nuestro estudio estuvieron a la sombra. Urdaz *et al.* (2006) solo enfriaron las vacas durante las 3 semanas finales del período seco, mientras que nosotros las refrigeramos durante el período seco completo. Estas diferencias experimentales podrían explicar la respuesta de rendimiento de leche aparentemente grande en el estudio actual en relación a informes anteriores.

Urdaz *et al.* (1982b) atribuyeron los efectos del estrés por calor durante la última etapa de la gestación a la producción reducida de hormonas placentarias y maternas, lo que a su vez redujo el crecimiento de la glándula mamaria y la función postparto. A pesar de que el estudio actual se concentró en un mecanismo endócrino alternativo relacionado con la señalización de la PRL, nuestros resultados no excluyen la posibilidad de que una reducción en la función placentaria podría también contribuir a un menor rendimiento de leche de las vacas expuestas a HT. En efecto, dado el espectro antes mencionado de respuestas a la reducción del estrés por calor en el período seco en el rendimiento subsiguiente, es probable que múltiples factores sean responsables por la pérdida de producción.

De acuerdo a nuestro conocimiento, este es el primer experimento para evaluar el efecto del estrés por calor bajo un fotoperíodo controlado

durante el período seco entero en la DMI. No sorprende, que la DMI real fuese menor en las vacas expuestas a HT durante el período seco entero (Tabla 3), sino que el ajuste para el BW haya eliminado esa diferencia. Sin embargo, las vacas expuestas a CL tuvieron menor DMI (como % del BW) a los 0 y +14 días postparto, probablemente debido a una mayor BCS de vacas expuestas a CL con relación a las vacas expuestas a HT (Tabla 3). En efecto, Hayirli *et al.* (2003) informaron que las vacas obesas tienen una caída mayor en la DMI como porcentaje del BW desde las últimas 3 semanas de gestación hasta la parición a comparación con las vacas normales, lo que corrobora los resultados en el experimento actual.

De manera similar a otros informes (Collier *et al.*, 1982a; Urdaz *et al.*, 2006), las concentraciones de NEFA en plasma durante el período preparición no fueron afectadas por el estrés por calor. Sin embargo, a los 0, +14 y +28 días con relación a la parición, las vacas expuestas a CL tuvieron mayores concentraciones de NEFA en comparación con las vacas expuestas a HT, lo que probablemente se deba a la menor DMI a los 0 y +14 días junto con la mayor producción de leche en las vacas enfriadas previamente. Holtenius *et al.* (2003) informaron que la magnitud del incremento en la concentración de NEFA en plasma después de la parición estaba inversamente relacionada con la DMI antes de la parición, lo que es consistente con nuestros resultados. Es importante enfatizar que las concentraciones de NEFA alrededor del momento de la parición fueron elevadas en las vacas expuestas a CL, pero no hasta un alcance patológico porque el rendimiento de la leche claramente no sufrió con relación a las vacas expuestas a HT. Por lo tanto, el enfriamiento preparición parece mejorar la capacidad de la vaca para navegar los desafíos metabólicos de la transición cuando se la compara con el estrés por calor. Además, se sabe que la PRL está involucrada en la regulación del metabolismo de las grasas en varias especies (Ling and Billig, 2001) a través de la supresión de la lipoproteína lipasa en el tejido adiposo (Zinder *et al.*, 1974). Por lo tanto, las mayores concentraciones de PRL en las vacas expuestas a HT posiblemente suprimirían la actividad de la lipoproteína lipasa

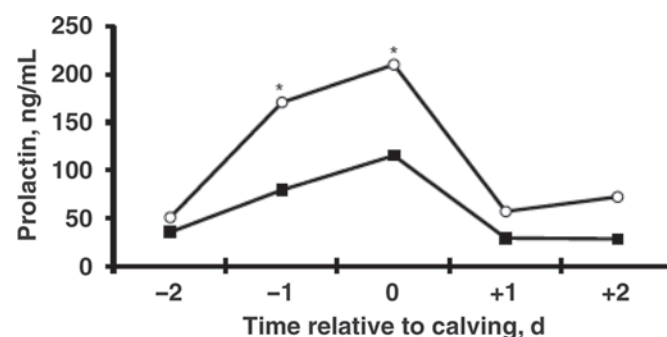


Figura 4. Efecto del enfriamiento (CL; $n = 7$) o estrés por calor (HT; $n = 9$) durante un período seco de 46 días sobre las concentraciones de prolactina desde los -2 hasta los +2 días con relación a la parición. Los cuadrados sólidos (■) representan la concentración de prolactina de las vacas expuestas a CL, y los círculos abiertos (○) representan las concentraciones de prolactina de las vacas expuestas a HT. Las vacas expuestas a HT tuvieron una mayor concentración de prolactina a los -1 días (171 vs. 79 ng/mL, SEM = 28 ng/mL; $P = 0.03$) y 0 días (210 vs. 115 ng/mL, SEM = 24 ng/mL; $P = 0.01$) con relación a la parición. * $P < 0.05$. Después de la parición, las vacas se alojaron juntas en el mismo establo equipado con ventiladores y rociadores.

Tabla 4. Expresión del ARNm hepático de la acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga (*ACADVL*), supresor de la señalización de citocinas-2 (*SOCS-2*), y de la proteína 5 ligadora del factor de crecimiento similar a la insulina (*IGFBP-5*) de las vacas expuestas al estrés por calor ($n = 5$) o enfriamiento ($n = 4$) durante un período seco esperado de 46 días a los -46, -20, +2 y +20 días con relación a la parición.¹

Gen	Estrés por calor ²			Enfriamiento ²			SE	Valor P^3		
	-20	+2	+20	-20	+2	+20		Trt	Día	Trt × día
	% del valor de referencia									
<i>ACADVL</i>	111	73	176	94	175	101	22	0,83	0,28	0,03
<i>SOCS-2</i>	55	55	66	123	127	153	26	0,03	0,62	0,95
<i>IGFBP-5</i>	93	47	117	88	107	113	17	<0,0001	0,58	0,54

¹La muestra tomada a los -46 días con relación a la parición se consideró el nivel de referencia.

²Se recolectaron biopsias a los -20, +2 y +20 días con relación a la parición.

³Trt = tratamiento.

en el tejido adiposo de manera tal que se redujo la hidrólisis lipídica, y, en consecuencia, disminuyeron los NEFA.

Luego del incremento de las concentraciones de NEFA en el plasma de las vacas expuestas a CL, hubo un incremento en las concentraciones de BHBA en el plasma a los +14 y +28 días con relación a la parición. Una explicación para esta respuesta es que una sobrecarga de NEFA en el hígado, y el subsiguiente exceso de acetil-CoA que no pudo ingresar al ciclo del TCA, provocó un cambio en la ruta hacia la producción de cuerpos cetónicos. Pero, de manera similar a los NEFA incrementados, las mayores concentraciones de BHBA no comprometieron el desempeño en la lactancia. Esto sugiere que las vacas expuestas a CL, con relación a las vacas expuestas a HT, tuvieron una mayor capacidad para lidiar con una movilización lipídica incrementada en sostén de un mayor rendimiento de leche. Douglas *et al.* (2006) informaron que las vacas a las que se alimentó *ad libitum* en la preparación tuvieron mayor BCS durante el período seco, una mayor caída en la DMI alrededor de la parición, y concentraciones incrementadas de NEFA y BHBA postparición, similares al experimento actual. Esta es una adaptación metabólica para sostener la lactancia durante el período de transición (Drackley, 1999).

La enzima *ACADVL* es una de las 5 acil-CoA deshidrogenasas que catalizan el paso inicial, limitador de la velocidad de la β -oxidación de los ácidos grasos mitocondriales (McAndrew *et al.*, 2008). La grasa movilizada desde el tejido adiposo es oxidada en el hígado por la *ACADVL*. La expresión del ARNm hepático de la *ACADVL* se reguló hacia arriba a los +2 días con relación a la parición en las vacas expuestas a CL versus las vacas expuestas a HT. Esto es consistente con la adaptación metabólica hepática para acomodar una mayor movilización lipídica alrededor de la parición. Sin embargo, inesperadamente, la expresión del ARNm de la *ACADVL* se reguló hacia abajo a los +20 días con relación a la parición en las vacas expuestas a CL en comparación con las vacas expuestas a HT a pesar de las mayores concentraciones de NEFA en plasma.

No se comprenden bien los mecanismos mediante los cuales se controla la sensibilidad a la PRL (Tam *et al.*, 2001). Las proteínas supresoras de la señalización de citocina comprenden una familia de proteínas intracelulares (Yoshimura *et al.*, 2007) que son estimuladas por la PRL y que actúan a través de retroalimentación para inhibir la señalización de la citocina (Wall *et al.*, 2005b). Por ejemplo, las

inyecciones de PRL a ratas en lactancia tratadas con bromocriptina indujeron la expresión de ARNm de las *SOCS-1*, *SOCS-2* y *SOCS-3* en el ovario, pero no se observó ningún incremento en las *SOCS-2* en la glándula adrenal (Tam *et al.*, 2001). Las vacas expuestas a un fotoperíodo de día corto tienen menores concentraciones de PRL en plasma (Dahl, 2008) y menos expresión de ARNm de las *SOCS-2* en la glándula mamaria a los -24 días con relación a la parición (Wall *et al.*, 2005b). Sin embargo, en el estudio actual, la *SOCS-2* se expresó en gran medida en el hígado de las vacas expuestas a CL en comparación con las vacas expuestas a HT, posiblemente debido a diferencias en la especificidad de los tejidos entre el hígado y la glándula mamaria. Hasta la fecha, solo hay información limitada sobre los efectos del estrés por calor sobre la expresión genética de la glándula mamaria en vacas lecheras, y sería relevante investigar más allá la expresión de los genes señalizadores de la PRL en la glándula mamaria de los animales estresados por calor.

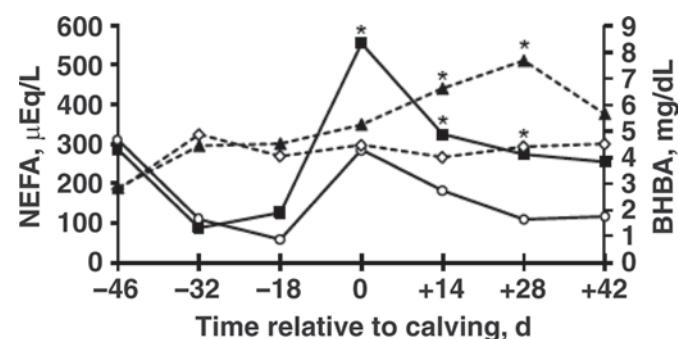


Figura 5. Efecto del enfriamiento (CL; $n = 7$) o estrés por calor (HT; $n = 9$) durante un período seco de 46 días sobre las concentraciones de prolactina de los NEFA desde el secado hasta los +42 días con relación a la parición. Los cuadrados con líneas sólidas ($\square$) representan la concentración de NEFA de las vacas expuestas a CL, y las líneas sólidas con círculos abiertos ($\circ$) representan las concentraciones de NEFA de las vacas expuestas a HT. Las líneas discontinuas con triángulos sólidos ($\triangle$) representan las concentraciones de BHBA de las vacas expuestas a CL, y la línea discontinua con triángulos abiertos ($\triangle$) representa la concentración de BHBA de las vacas expuestas a HT. Las vacas expuestas a CL tuvieron una mayor concentración de NEFA a los 0, +14 y +28 días con relación a la parición. Las vacas expuestas a HT tuvieron una mayor concentración de BHBA a los 0, +14 y +28 días con relación a la parición. * $P < 0,05$; SEM = 50 μ Eq/L para NEFA y SEM = 1,5 mg/dL para BHBA. Después de la parición, las vacas se alojaron juntas en el mismo establo equipado con ventiladores y rociadores.

Tabla 5. Perfiles de ácidos grasos en la leche de vacas expuestas a estrés por calor (HT; n = 9) o enfriamiento (CL; n = 7) durante un período seco objetivo de 46 días¹

Ácidos grasos ²	HT	CL	SEM	Valor P
	% de ácido graso identificado			
C6:0	2,49	2,26	0,12	0,21
C8:0	1,63	1,37*	0,08	0,05
C10:0	3,83	3,00**	0,21	0,01
C12:0	4,33	3,30**	0,25	0,01
C14:0	13,18	10,78*	0,69	0,02
C15:0	1,19	0,85**	0,07	<0,01
C16:0	33,50	32,16	0,90	0,30
C16:1 <i>cis</i> -9	0,37	0,33*	0,01	0,04
C17:0	0,73	0,71	0,02	0,46
C18:0	13,06	13,95	0,53	0,25
C18:1 familia <i>trans</i> 1,72	1,53	0,08	0,09	
C18:1 <i>cis</i> -9 18,96	25,20*	1,90	0,03	
C18:2 n-6	3,63	3,38	0,11	0,12
CLA <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11	0,63	0,51**	0,03	<0,01
CLA <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12	ND ³	ND	ND	—
C20:0	0,15	0,14	0,01	0,59
C18:3 n-3	0,33	0,28**	0,01	0,01
C20:4 n-6	0,23	0,19*	0,01	0,04
ácidos grasos de novo ⁴	43,40	37,65*	1,69	0,02
MUFA ⁵	21,06	27,06*	1,87	0,03
PUFA ⁶	4,83	4,36**	0,12	0,01
PUFA/MUFA	0,29	0,17	0,05	0,13

¹Los valores representan las medias de las muestras de leche matutinas y vespertinas diarias durante las semanas 5 y 6 postpartición (n = 14) acumuladas en base al rendimiento de leche.

²CLA = ácido linoleico conjugado.

³ND = no detectado.

⁴Ácidos grasos de novo = C6:0 + C8:0 + C10:0 + C12:0 + C14:0 + C15:0 + (C16:0/2).

⁵Ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) = C16:1 *cis*-9 + C18:1 familia *trans* + C18:1 *cis*-9.

⁶Ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) = C18:2 + C18:3 + *cis*-9, *trans*-11 CLA + *trans*-10, *cis*-12 CLA + C20:4.

*P < 0,05; **P < 0,01.

Otra explicación para el incremento en la expresión del ARNm de las SOCS-2 en el hígado de las vacas expuestas a CL podría estar vinculada a los estrógenos. Collier *et al.* (1982b) informaron que las vacas secas a la sombra tuvieron mayores concentraciones de sulfato de estrona en plasma y concentraciones mayores numéricamente de estradiol-17 β (**E₂**) en comparación con las vacas expuestas al estrés por calor. Las concentraciones de E₂ se incrementan en la parición, y la hormona regula hacia arriba las SOCS-2 (Winkelman *et al.*, 2008). Leong *et al.* (2004) informaron que el tratamiento a corto plazo de ratones con E₂ no reguló hacia arriba el ARNm de las SOCS-2 hepático. Sin embargo, los ratones que recibieron inyecciones de E₂ durante 3 semanas tuvieron mayores ARNm de SOCS-2 que los controles, lo que indica que la regulación hacia arriba de las SOCS-2 requiere elevaciones a largo plazo del E₂. En el experimento actual, las vacas expuestas a CL regularon hacia arriba la expresión del ARNm de las SOCS-2 en el hígado en comparación con las vacas expuestas a HT, posiblemente debido a una mayor concentración de E₂ en plasma durante el período seco entero que los animales expuestos a estrés por calor.

Parece que la IGFBP-5 tiene un doble papel en la renovación del tejido al reducir la disponibilidad de IGF-I del factor de supervivencia, así como al incrementar la degradación de la matriz extracelular, coordinando por lo tanto la apoptosis y remodelación de los tejidos (Nørgaard *et al.*, 2008).

Las vacas expuestas a CL habían regulado hacia arriba la expresión del ARNm hepático de la IGFBP-5 en comparación con las vacas expuestas a HT. Durante la involución de la glándula mamaria en los roedores, las células epiteliales mamarias incrementan la producción de IGFBP-5, y la PRL evita este incremento en la IGFBP-5 (Allan *et al.*, 2004). Debido a que el hígado atraviesa cambios metabólicos drásticos en la preparación para la lactancia, la mayor PRL circulante en las vacas expuestas a PRL podría haber limitado el incremento normal en la IGFBP-5 y, por lo tanto, la remodelación hepática, preparando el terreno para una reducción en la capacidad del metabolismo lipídico con relación al de las vacas expuestas a CL.

La leche contiene ácidos grasos que derivan de la síntesis de novo por parte de la glándula mamaria (C4:0 a C14:0 más una porción del C16:0) y de la absorción mamaria de los ácidos grasos preformados (es decir, una porción del C16:0 y todos los ácidos grasos de cadena más larga; Zheng *et al.*, 2005). En el estudio actual, la mayor movilización lipídica de las vacas expuestas a CL probablemente influyó en la síntesis de novo de ácidos grasos en la glándula mamaria y en la absorción de ácidos grasos preformados. Con relación a las vacas expuestas a HT, los ácidos grasos más comunes en el tejido adiposo (C16:0 y *cis* C18:1) estuvieron en mayor

Tabla 6. Perfiles de ácidos grasos hepáticos de las vacas expuestas a estrés por calor (HT; n = 9) o enfriamiento (CL; n = 7) durante un período seco objetivo a los 46, -20 +2, y +20 días con relación a la parición.

Ácido graso ¹	Estrés por calor ²				Enfriamiento ²				SE	Valor <i>P</i> ³		
	-46	-20	+2	+20	-46	-20	+2	+20		Trt	Día	Trt × día
	% del ácido graso identificado											
C14:0	0,31	0,40	0,44	0,38	0,38	0,28	1,80	1,35	0,41	0,24	0,45	0,34
C16:0	7,40	7,05	15,96	13,36	8,23	9,83	26,75	18,23	2,49	0,06	<0,0001	0,09
C16:1 <i>cis</i> -9	0,13	0,33	0,08	0,14	0,05	0,10	0,23	0,18	0,11	0,79	0,66	0,14
C17:0	1,32	1,38	1,10	1,36	1,28	1,55	0,85	1,28	0,14	0,74	0,04	0,37
C18:0	34,38	34,23	28,48	30,04	35,08	33,90	19,65	26,48	1,90	0,18	<0,001	0,03
C18:1 familia <i>trans</i>	0,75	1,10	0,74	0,66	0,70	0,80	0,85	0,75	0,14	0,72	0,34	0,48
C18:1 <i>cis</i> -9	10,02	13,24	15,76	13,58	9,00	10,55	26,75	18,45	2,56	0,30	<0,001	0,01
C18:2 n-6	15,06	12,46	13,14	15,78	13,95	12,13	9,95	13,45	0,83	0,10	<0,001	0,17
CLA <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11	0,07	0,12	0,22	0,16	0,15	0,14	0,22	0,17	0,05	0,63	0,21	0,68
CLA <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12	0,03	0,00	0,02	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,45	0,43	0,42
C18:3 n-3	0,46	0,84	0,80	0,63	0,45	0,94	0,88	0,60	0,08	0,66	<0,0001	0,76
C20:0	0,05	0,07	0,09	0,09	0,06	0,07	0,06	0,05	0,07	0,58	0,67	0,62
C20:3 n-6	10,41	8,01	5,92	7,04	11,18	9,62	2,92	6,02	0,89	0,80	<0,0001	0,01
C20:4 n-6	11,96	12,65	10,60	10,36	11,75	11,80	5,78	8,48	0,86	0,05	<0,001	0,10
C20:5 n-3	0,89	0,70	0,86	0,79	0,83	0,87	0,49	0,58	0,13	0,47	0,14	0,03
C22:4 n-6	3,20	3,88	2,58	2,46	3,65	3,82	1,15	1,70	0,40	0,30	<0,0001	0,08
C22:5 n-3	3,14	3,39	2,86	2,88	2,98	3,30	1,50	2,10	0,38	0,13	0,01	0,09
C22:6 n-3	0,31	0,27	0,34	0,28	0,30	0,33	0,21	0,31	0,12	0,94	0,98	0,60
MUFA ⁴	10,86	14,62	16,58	14,38	9,75	11,45	27,82	19,38	2,60	0,30	<0,001	0,01
PUFA ⁵	45,79	42,50	37,35	40,40	45,23	42,96	23,10	33,40	3,00	0,12	<0,001	0,03
PUFA/MUFA	4,67	3,14	2,39	3,50	4,78	3,77	0,87	2,27	0,63	0,47	<0,001	0,12
relación n-6/n-3 ⁶	1,84	1,94	2,25	2,50	1,64	1,60	2,77	2,69	0,28	0,88	0,01	0,23

¹CLA = ácido linoleico conjugado.²Se recolectaron biopsias a los -45, -20, +2, y +20 d con relación a la parición.³Trt = tratamiento.⁴Ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) = C16:1 *cis*-9 + C18:1 familia *trans* + C18:1 *cis*-9.⁵Ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) = C18:2 + C18:3 + CLA *cis*-9, *trans*-11 + CLA *trans*-10, *cis*-12 + C20:3 + C20:4 + C20:5 + C22:5 + C22:6.⁶Relación n-6/n-3 = (C18:2 + CLA *cis*-9, *trans*-11 + CLA *trans*-10, *cis*-12 + C20:4)/(C18:3 + C20:3 + C20:5 + C22:5 + C22:6).

concentración en la leche de las vacas expuestas a CL, mientras que se redujeron los ácidos grasos sintetizados de novo. Rukkwamsuk *et al.* (2000) informaron que el C16:0 y C18:1 *cis* fueron mayores en el plasma de las vacas que fueron sobrealimentadas durante el período de parto y que movilizaron más reservas corporales, indicando que estos ácidos grasos preformados fueron ocupados por la glándula mamaria como se informó en el estudio actual.

Las proporciones de los diversos ácidos grasos en el hígado de las vacas lecheras son influenciadas principalmente por la absorción hepática de los ácidos grasos de la circulación, y en menor medida, por su metabolismo (es decir, síntesis de novo, desaturación, y elongación en cadena de los ácidos grasos dentro del hígado; Sato *et al.*, 2004). La capacidad de fotosíntesis (Emery *et al.*, 1992), así como la desaturación (Bell, 1981; St. John *et al.*, 1991), de los ácidos grasos es limitada en el hígado del rumiante. Además, la composición lipídica hepática en el período postparto temprano puede alterarse por las dietas preparto o por la amplia movilización de grasa corporal alrededor de la parición, cuando el balance de energía es mayormente negativo (Drackley *et al.*, 2001). Los ácidos grasos que son más comunes en el tejido adiposo

(C16:0 y C18:1 *cis*) fueron mayores en el hígado de las vacas expuestas a CL en comparación con las vacas expuestas a HT (Tabla 5), lo que refleja una mayor movilización lipídica. De manera similar, Rukkwamsuk *et al.* (2000) informaron que las vacas sobrealimentadas durante el período seco tuvieron una concentración mayor de C18:1 *cis* y una concentración numéricamente mayor de C16:0 a las 0,5 semanas postparto en comparación con las vacas con alimentación limitada, lo que también es un reflejo de mayores concentraciones de NEFA postparto.

En resumen, la reducción del estrés por calor durante el período seco entero mejoró el rendimiento de la lactancia subsiguiente, y esto se asoció a una supresión de las concentraciones de PRL en plasma y a los cambios en la expresión genética metabólica hepática que son mediados probablemente a través de las rutas de señalización de la PRL. A comparación con el período seco, la regulación hacia arriba de las *SOCS-2* y la *IGFBP-5* podría contribuir a la optimización de la capacidad metabólica hepática de las vacas lecheras para sostener el desafío energético de la lactancia temprana. Además, la regulación hacia arriba hepática de la *ACADVL* indica una mejora en el metabolismo lipídico hepático para lidiar con la movilización de grasas y soportar una mayor

producción de leche. Por lo tanto, la reducción del estrés por calor durante el período seco entero es una herramienta de manejo prometedora para mejorar la transición hacia la lactancia.

RECONOCIMIENTOS

Le agradecemos al personal de la Unidad de Investigación Lechera, Instituto de Ciencias Alimentarias y Agrícolas, Universidad de Florida, especialmente a Eric Diepersloot, por el cuidado de las vacas y la asistencia para obtener los datos recolectados en el presente estudio.

REFERENCIAS

- Allan, G. J. J. Beattie, and D. J. Flint. 2004. The role of IGFBP-5 in mammary gland development and involution. *Domest. Anim. Endocrinol.* 27:257–266.
- Auchtung, T. L., A. G. Rius, P. E. Kendall, T. B. McFadden, and G. E. Dahl. 2005. Effects of photoperiod during the dry period on prolactin, prolactin receptor, and milk production of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88:121–127.
- Auchtung, T. L., J. L. Salak-Johnson, D. E. Morin, C. C. Mallard, and G. E. Dahl. 2004. Effects of photoperiod during the dry period on cellular immune function of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87:3683–3689.
- Avendaño-Reyes, L., F. D. Alvarez-Valenzuela, A. Correa-Calderón, J. S. Saucedo-Quintero, P. H. Robinson, and J. G. Fadel. 2006. Effect of cooling Holstein cows during the dry period on postpartum performance under heat stress conditions. *Livest. Sci.* 281:2535–2547.
- Bell, A. W. 1981. Lipid metabolism in liver and selected tissues and in the whole body of ruminant animals. Page 363 in *Lipid Metabolism in Ruminant Animals*. W. W. Christie, ed. Pergamon Press, Oxford, UK.
- Chouinard, P. Y., L. Corneau, A. Sæbø, and D. E. Bauman. 1999. Milk yield and composition during abomasal infusion of conjugated linoleic acid. *J. Dairy Sci.* 82:2737–2745.
- Collier, R. J., D. K. Beede, W. W. Thatcher, L. A. Israel, and C. J. Wilcox. 1982a. Influences of environment and its modification on dairy animal health and production. *J. Dairy Sci.* 65:2213–2227.
- Collier, R. J., J. L. Collier, R. P. Rhoads, and L. H. Baumgard. 2008. Invited review: Genes involved in bovine heat stress response. *J. Dairy Sci.* 91:445–454.
- Collier, R. J., G. E. Dahl, and M. J. VanBaale. 2006. Major advances associated with environmental effects on dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 89:1244–1253.
- Collier, R. J., S. G. Doelger, H. H. Head, W. W. Thatcher, and C. J. Wilcox. 1982b. Effects of heat stress during pregnancy on maternal hormone concentrations, calf birth weight and postpartum milk yield of Holstein cows. *J. Anim. Sci.* 54:309–319.
- Connor, E. E., E. D. Thomas, and G. E. Dahl. 2007. Photoperiod alters metabolic gene expression in bovine liver potentially through suppressors of cytokine signaling. *J. Anim. Sci.* 85(Suppl. 1):208. (Abstr.)
- Coulombe, J. J., and L. Favreau. 1963. A new simple method for colorimetric determination of urea. *Clin. Chem.* 9:102–108.
- Dahl, G. E. 2008. Effects of short day photoperiod on prolactin signaling in dry cows: A common mechanism among tissues and environments. *J. Anim. Sci.* 86:10–14.
- do Amaral, B. C., E. E. Connor, S. Tao, J. Hayen, J. Bulbolz, and G. E. Dahl. 2009. Heat stress abatement during the dry period influences prolactin signaling in lymphocytes. *Domest. Anim. Endocrinol.* doi:10.1016/j.domaniend.2009.07.005
- Douglas, G. N., T. R. Overton, H. G. Bateman II, H. M. Dann, and J. K. Drackley. 2006. Prepartal plane of nutrition, regardless of dietary energy source, affects periparturient metabolism and dry matter intake in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 89:2141–2157.
- Drackley, J. K. 1999. Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier? *J. Dairy Sci.* 82:2259–2273.
- Drackley, J. K., T. R. Overton, and G. N. Douglas. 2001. Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. *J. Dairy Sci.* 84(E. Suppl.):E100–E112.
- Edmonson, A. J., I. J. Lean, L. D. Weaver, T. Farver, and G. Webster. 1989. A body condition score chart for Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72:68–78.
- Emery, R. S., J. S. Liesman, and T. H. Herdt. 1992. Metabolism of long chain fatty acids by ruminant liver. *J. Nutr.* 122(Suppl. 3):832–837.
- Gochman, N., and J. M. Schmitz. 1972. Application of a new peroxide indicator reaction to the specific automated determination of glucose with glucose oxidase. *Clin. Chem.* 18:943–950.
- Hayirli, A., R. R. Grummer, E. V. Nordheim, and P. M. Crump. 2003. Models for predicting dry matter intake of Holsteins during the prefresh transition period. *J. Dairy Sci.* 86:1771–1779.
- Holtenius, K., S. Agenes, C. Delavaud, and Y. Chilliard. 2003. Effects of feeding intensity during the dry period. 2. Metabolic and hormonal responses. *J. Dairy Sci.* 86:883–891.
- Johnson, M. M., and J. P. Peters. 1993. Technical note: An improved method to quantify non-esterified fatty acids in bovine plasma. *J. Anim. Sci.* 71:753–756.
- Kramer, J. K. G., V. Feliner, M. E. R. Dugan, F. D. Sauer, M. M. Mossoba, and M. P. Yarawecz. 1997. Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total *trans* fatty acids. *Lipids* 32:1219–1228.
- Leong, G. M., S. Moverare, J. Brce, N. Doyle, K. Sjögren, K. Dahlman-Wright, J. Gustafsson, K. K. Y. Ho, C. Ohlsson, and K. Leung. 2004. Estrogen up-regulates hepatic expression of suppressors of cytokine signaling-2 and -3 in vivo and in vitro. *Endocrinology* 145:5525–5531.
- Ling, C., and H. Billig. 2001. PRL receptor-mediated effects in female mouse adipocytes: PRL induces suppressors of cytokine signaling expression and suppresses insulin-induced leptin production in adipocytes in vitro. *Endocrinology* 142:4880–4890.
- Littell, R. C., G. A. Milliken, W. W. Stroup, and R. D. Wolfinger. 1996. *SAS for Mixed Models*. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Loor, J. J., H. M. Dann, R. E. Everts, R. Oliveira, C. A. Green, N. A. Guretzky, S. L. Rodriguez-Zas, H. A. Lewin, and J. K. Drackley. 2005. Temporal gene expression profiling of liver from periparturient dairy cows reveals complex adaptive mechanisms in hepatic function. *Physiol. Genomics* 23:217–226.
- Marsh, W. H., B. Fingerhut, and H. Miller. 1965. Automated and manual direct methods for the determination of blood urea. *J. Clin. Chem.* 6:624–627.
- McAndrew, R. P., Y. Wang, A. W. Mohsen, M. He, J. Vockley, and J. Kim. 2008. Structural basis for substrate fatty acyl chain specificity: Crystal structure of human very-long chain acyl-CoA dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 283:9435–9443.
- Nørgaard, J. V., P. K. Theil, M. T. Sorensen, and K. Sejrsen. 2008. Cellular mechanisms in regulating mammary cell turnover during lactation and dry period in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91:2319–2327.
- Rukkwamsuk, T., M. J. H. Geelen, T. A. M. Kruuip, and T. Wensing. 2000. Interrelation of fatty acid composition in adipose tissue, serum, and liver of dairy cows during the development of fatty liver postpartum. *J. Dairy Sci.* 83:52–59.
- Sato, H., T. Mohamed, A. Goto, S. Oikawa, and T. Kurosawa. 2004. Fatty acid profiles in relation to triglyceride level in the liver of dairy cows. *J. Vet. Med. Sci.* 66:85–87.
- Savage, D. B., C. S. Choi, V. T. Samuel, Z. X. Liu, D. Zhang, A. Wang, X. M. Zhang, G. W. Cline, X. X. Yu, J. G. Geisler, S. Bhanot, B. P. Monia, and G. I. Shulman. 2006. Reversal of diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance by antisense oligonucleotide inhibitors of acetyl-CoA carboxylases 1 and 2. *J. Clin. Invest.* 116:817–824.
- Schams, D., and V. Reinhardt. 1974. Influence of the season on plasma prolactin levels in cattle from birth to maturity. *Horm. Res.* 5:217–226.

- St. John, L. C., D. K. Lunt, and S. B. Smith. 1991. Fatty acid elongation and desaturation enzyme activities of bovine liver and subcutaneous adipose tissue microsomes. *J. Anim. Sci.* 69:1064–1073.
- Tam, S. P., P. Lau, J. Djiane, D. J. Hilton, and M. J. Waters. 2001. Tissue-specific induction of SOCS gene expression by PRL. *Endocrinology* 142:5015–5026.
- Tyrrell, H. F., and J. T. Reid. 1965. Prediction of the energy value of cow's milk. *J. Dairy Sci.* 48:1215–1223.
- Urdaz, J. H., M. W. Overton, D. A. Moore, and J. E. P. Santos. 2006. Technical note: Effects of adding shade and fans to a feedbunk sprinkler system for preparturient cows on health and performance. *J. Dairy Sci.* 89:2000–2006.
- Wall, E. H., T. L. Auchtung, G. E. Dahl, S. E. Ellis, and T. B. McFadden. 2005a. Exposure to short day photoperiod during the dry period enhances mammary growth in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88:1994–2003.
- Wall, E. H., T. L. Auchtung-Montgomery, G. E. Dahl, and T. B. McFadden. 2005b. Short communication: Short-day photoperiod during the dry period decreases expression of suppressors of cytoline signaling in mammary gland of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88:3145–3148.
- Winkelman, L. A., M. C. Lucy, T. H. Elsasser, J. L. Pate, and C. K. Reynolds. 2008. Short communication: Suppressor of cytokine signaling-2 mRNA increases after parturition in the liver of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91:1080–1086.
- Wolfenson, D., I. Flamembaum, and A. Berman. 1988. Dry period heat stress relief effects on prepartum progesterone, calf birth weight, and milk production. *J. Dairy Sci.* 71:809–818.
- Yoshimura, A., T. Naka, and M. Kubo. 2007. SOCS proteins, cytokine signaling and immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* 7:454–465.
- Zheng, H. C., J. X. Liu, J. H. Yao, Q. Yuan, H. W. Ye, J. A. Ye, and Y. M. Wu. 2005. Effects of dietary sources of vegetable oils on performance of high-yielding lactating cows and conjugated linoleic acids in milk. *J. Dairy Sci.* 88:2037–2042.
- Zinder, O., M. Hamosh, T. R. Fleck, and R. O. Scow. 1974. Effect of prolactin on lipoprotein lipase in mammary glands and adipose tissue of rats. *Am. J. Physiol.* 226:742–748.