

Mastitis, fertilidad y eficiencia de las biotecnologías de reproducción asistida en el trópico

Mastitis, fertility and efficiency of assisted reproduction biotechnologies in the tropics

Rodolfo Pedroso Sosa^{1*}, Felicia Roller Gutiérrez²

¹ Instituto de Investigaciones, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Técnica de Manabí. Santa Ana, Manabí, Ecuador.

² Facultad de Ciencias Zootécnicas, Universidad Técnica de Manabí. Chone, Manabí, Ecuador.

* **Autor para correspondencia:** rpedroso@utm.edu.ec

Resumen

La mastitis bovina es la enfermedad más importante desde el punto de vista económico en el ganado productor de leche. En este documento se exponen los hallazgos experimentales relacionados al efecto de esta afección en el comportamiento reproductivo y la eficiencia de las tecnologías de reproducción asistida de las vacas lecheras. Se presenta el probable mecanismo fisiopatológico mediante el cual esta dolencia ocasiona severos trastornos y se citan algunas de las estrategias disponibles para disminuir su prevalencia, así como mejorar la fertilidad de las vacas afectadas y la eficacia de las biotecnologías reproductivas y la fertilidad de la descendencia.

Palabras clave: mastitis, inflamación, endocrino, transición, ovocito, fertilización, maduración, suplementación, biotecnología.

Abstract

Bovine mastitis is the most important disease amongst dairy cattle from the economic point of view. This paper discusses experimental findings regarding the effect of this disease on reproductive performance and on the efficiency of assisted reproduction technologies for dairy cows. The likely pathophysiological mechanism by which this disease causes severe disorders is presented, with citation of some of the strategies available both to reduce its prevalence and to improve the fertility of affected cows, the effectiveness of the reproductive biotechnologies and the fertility of offspring.

Key words: mastitis, inflammation, endocrine, transition, oocyte, fertilization, maturation, supplementation, biotechnology



Recibido: 16 de octubre, 2016
Aceptado: 7 de noviembre, 2016

Introducción

La mastitis es una enfermedad global que aqueja entre el 10% y 80% de las vacas lecheras (Hert, *et al.*, 2010). Este trastorno afecta la cantidad y calidad de la leche, generando grandes pérdidas económicas (Bar *et al.*, 2008; Moussavi, Mesgaran & Gilbert, 2012; Fodor, Dunnay & Ozsvári, 2013). También ejerce un efecto negativo en la fertilidad (Gunay & Gunay, 2008; Nava-Trujillo, Soto-Belloso & Hoet, 2010; Hudson, Bradley, Breen & Green, 2012) y la eficiencia de las tecnologías de reproducción asistida (Scenna, 2006; Roth *et al.*, 2013), todo ello asociado a los cambios sistémicos, endocrinos (Schrick *et al.*, 2001; Hansen, 2007; Fabian *et al.*, 2010) celulares y moleculares se que producen en el animal (Rahman *et al.* 2012; Bromfield & Sheldon, 2013).

La mayoría de estos estudios fueron realizados en la ganadería de cría intensiva y en ganado de alta producción, bajo las condiciones de climas templados, en ausencia de estrés nutricional, calórico y en condiciones diferentes de control y estado de salud de los rebaños. Por ello, esta revisión de la literatura muestra los resultados más notables de las investigaciones dirigidas a establecer la interacción de la mastitis en la vaca lechera, el comportamiento reproductivo y la eficiencia de las tecnologías de reproducción asistida, con el fin de servir de base para el desarrollo de investigaciones en las condiciones de la ganadería mestiza de doble propósito y razas sintéticas criadas en pastoreo, bajo las condiciones climáticas del trópico.

Para el análisis de la información se emplearon

las bases de datos Electrónicas PubMed, Scopus, Web of Science y Web Animal Science como fuentes principales para obtener los artículos relacionados con los biomarcadores, el estrés oxidativo, los micronutrientes y su impacto en la salud, reproducción y eficiencia de las tecnologías de reproducción asistida. Las palabras clave utilizadas en la búsqueda fueron: mastitis, inflamación, endocrino, transición, ovocito, fertilización, maduración, suplementación, biotecnología.

Desarrollo

Efecto de la mastitis en el comportamiento de los parámetros reproductivos

Durante los últimos 10 años se realizaron diversos estudios con el objetivo de valorar el efecto de la mastitis en el comportamiento reproductivo de las vacas lecheras (Schrick *et al.*, 2001; Hudson *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2012). Se encontró que en las vacas que manifiestan mastitis durante los primeros 90 días del posparto y, previa la época de servicio (McDougall, Rhodes & Verkerk, 2005), se produce un aumento significativo de los intervalos interpartales (Gunay & Gunay, 2008; Gómez-Cifuentes, Molinet, Signorini, Scandelo, & Calvinlio 2014) y se incrementa el número de servicios por gestación (Ahmadzadeh *et al.*, 2009). Además, tienen 2,40 veces más riesgo de pérdida de la preñez (Huszenicza *et al.*, 2005; Moore, Overton, Chebel, Truscott & BonDurant, 2005; Perrin, Bostelman & Sheldon, 2007) y una menor posibilidad de concepción (Hansen, 2007; Cha *et al.*, 2013), independientemente de los microorganismos que la provocan (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de la mastitis clínica y subclínica sobre algunos parámetros reproductivos en vacas diagnosticadas con mastitis entre el primer servicio y la concepción (Adaptado de Schrick *et al.*, 2001).

Tipo de mastitis	Número de animales	IPPS	IPC	S/C
Clínica	81	77,3±2.7 ^a	110,0±6,9 ^a	2,1± 0,2
Subclínica	229	74,8±2.7 ^a	107,7±6,9 ^a	2,1± 0,2
No mastitis	326	67,8±2.2 ^b	85,4±5,8 ^b	1,6± 0,2

Leyenda: letras diferentes por columnas difieren entre sí $p < 0,05$.

IPPS= Intervalo parto primer celo; **IPC =** Intervalo parto concepción; **S/C=** Número de servicio por gestación.

También, un conjunto de pesquisas fue dirigido a comprobar el efecto de la intensidad de la respuesta inmunológica del organismo en vacas con mastitis, empleando como variable dependiente el número de células somáticas de la leche en el comportamiento reproductivo (Konig *et al.*, 2006; Morris *et al.*, 2009). Los primeros trabajos sobre este aspecto fueron desarrollados en Lituania por Juozaitiene y Juozaitis (2005). Estos investigadores estimaron la relación entre el número de células somáticas en la leche con el nivel de producción y la fertilidad en vacas de la raza Negra Blanca. Según sus resultados, el aumento del número de células somáticas de 100 000 a 800 000 células/ml en la leche, guardó una correlación positiva en un rango del $r= 0,36$ al $r= 0,44$ entre el número de células somáticas y el IPC, IPP, el periodo seco y el índice de inseminación (Tabla 2).

Más tarde, en Inglaterra, Hudson *et al.* (2012) comunicaron resultados similares. En los rebaños de bovinos estudiados se encontró una prevalencia de mastitis del 50% al 70%. Mostraron que cuando la mastitis se produjo 31 días después del servicio de inseminación artificial (IA), ocurrió una disminución del 18% de la tasa de preñez en las vacas que tuvieron células somáticas en la leche, entre 200 000 a 399 000 células/ml, y del 26%, si el número de células somáticas fue superior a 399 000 / ml.

Estos datos respaldan la idea de que la intensidad de la respuesta inmunitaria del organismo, ante el proceso inflamatorio que acompaña a la mastitis,

puede aumentar su efecto negativo en los eventos reproductivos. Aunque la fertilidad individual y del rebaño está condicionada por múltiples factores, en muchos estudios no se ha encontrado una estrecha relación entre mastitis y comportamiento reproductivo (Vacek, Stádnik & Strípková, 2007), pero es muy probable que este inconveniente se asocie a los modelos matemáticos empleados para hacer el análisis y el momento de ocurrencia de las mastitis, puesto que en la mayoría de las investigaciones únicamente se comparó la eficiencia reproductiva entre animales afectados y no afectados, sin considerar la interacción con otros factores como el rebaño, el número de inseminaciones, la paridad, época de partos, el nivel de producción de la vaca y el momento de la lactancia.

Al respecto, en estudios efectuados por Hertl *et al.* (2010) en los cuales fueron discriminados los efectos anteriores y algunos otros eventos de la salud reproductiva no asociados a la ocurrencia de mastitis, se comprobó que cuando la mastitis clínica se produce alrededor del tiempo de la inseminación artificial (IA), disminuye la probabilidad de concepción, efecto que es más severo si el microorganismo que la ocasiona es gram negativo. Además, se observó un aumento del número de servicios cuando la IA fue realizada durante la estación de mayor calor, y en vacas afectadas por retención de placenta.

Uno de los trabajos de mayor relevancia sobre el tema en las condiciones climáticas del trópico húmedo fue el efectuado por Nava-Trujillo *et*

Tabla 2. Correlación entre el número de células somáticas y el comportamiento reproductivo de vacas Negras-Blancas en Lituania (Adaptado de Jouzaitiene & Jouzaitis, 2005)

Índices del comportamiento reproductivo	Número de células somáticas	P
Índice de inseminación	0,44	< 0,01
IPC (días)	0,26	<0,01
IPP(días)	0,38	<0,01
Duración del período seco (días)	0,40	<0,01
Producción de leche (kg)	0,07	<0,01
Producción de leche (kg)	-0,35	<0,01

Leyenda: IPC= intervalo parto-concepción; IPP= intervalo parto-parto

al. (2010) en Venezuela. En vacas mestizas *Bos indicus* de doble propósito comprobaron que la mastitis clínica ocurrida entre el período que media del parto al primer celo, provoca una prolongación del IPPS (136 vs 98 días) y PC (187 vs 143 días), cuando fueron comparadas con las vacas que no exhibieron la enfermedad ($p < 0,05$). Este efecto es más severo en las vacas primíparas y solo afecta el comportamiento reproductivo cuando ocurre durante los primeros 62 días de inicio de la lactancia. Sin embargo, no se encontró diferencias significativas en el número de servicios por concepción entre ambos grupos.

Recientemente Torres *et al.* (2016) mostraron la tasa de prevalencia y la relación con los trastornos reproductivos de esta enfermedad en vacas lecheras criadas en pastoreo, bajo las condiciones del trópico húmedo. En un rebaño de vacas Jersey y Siboney con deficiencias de cobre, durante los primeros 60 días posteriores al parto, encontraron una prevalencia de la mastitis subclínica del 68,5%. En estas vacas, la mastitis tuvo una relación significativa ($r = 0,56$ $p < 0,05$) con las repeticiones del servicio y el anestro posterior al parto.

En la actualidad existe poca información sobre el efecto de la mastitis en los parámetros reproductivos de los países de climas cálidos, especialmente en el ganado cruzado y las razas sintéticas producto del cruzamiento entre el *Bos indicus* x *Bos taurus*, criado en pastoreo (Torres *et al.*, 2016). Por ello, resulta novedoso caracterizar la relación que existe entre la ocurrencia de mastitis y el comportamiento reproductivo de estos genotipos criados en pastoreo, en el trópico.

Respuesta sistémica y perfil endócrino de vacas afectadas de mastitis

Diversas investigaciones tienen como objetivo conocer si los procesos inflamatorios fuera del aparato reproductor pueden ejercer un efecto negativo en la calidad y desarrollo del embrión preimplantado. Estos estudios constituyen la base para explicar los mecanismos mediante los cuales la ocurrencia de mastitis puede afectar la

fertilidad de las vacas (Chebel, 2007; Fabian *et al.*, 2010).

La mastitis y el proceso inflamatorio específico y común que la acompaña, provocan una serie de cambios sistémicos tales como disminución de la motilidad del rumen, depresión general, taquicardia, disminución de los niveles de hierro y zinc, y aumento de la temperatura corporal (Ballou, 2012). Estos síntomas son la respuesta del organismo a la ocurrencia de mastitis clínica o subclínica. Al respecto, se ha comprobado que bajo el efecto del incremento de la temperatura corporal, a causa de la mastitis, disminuye el crecimiento y desarrollo del folículo ovárico y la manifestación del celo. Además se retrasa el período estro-ovulación, se reduce la capacidad de fertilización del ovocito maduro y se deprime el desarrollo del embrión *in-vivo* o cultivado *in-vitro* (Hansen, 2007; Hansen, 2009).

Otras transformaciones importantes lo constituyen el estrés oxidativo que se origina en respuesta al proceso infeccioso, caracterizado por un aumento notable de los nitratos y nitritos, la disminución del ácido ascórbico en el suero sanguíneo y la actividad de la enzima Mieloperoxidasa, con capacidad de desintegración de las proteínas. También se produce un incremento de la síntesis y secreción de citoquinas mediadoras del proceso inflamatorio (interleukin, $IL-1\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$, $IL-8$, $IL-10$, $IL-12$, $TNF-\alpha$, $IFN-\beta$), y $PGF2\alpha$, cuya acción puede inducir la regresión del cuerpo lúteo y la pérdida de la preñez (Stakheeva & Plemyashov, 2007; Walusimbi & Pate, 2013).

Uno de los aspectos de mayor importancia dentro de los cambios sistémicos que ocurren durante el desarrollo de mastitis es la reacción y transferencia de las células polimorfas nucleares de la sangre, al sitio de inflamación en la ubre. Este fenómeno es el que produce el exceso de los neutrófilos, macrófagos, linfocitos y eosinófilos en la leche (Sordillo, 2009; Jóźwik *et al.*, 2012). En este sentido, estudios recientes enfatizan que existe una relación negativa y significativa entre el número de células somáticas en la leche y la fertilidad de las vacas (Morek- Kopeć, Zarnecki & Jagusiak, 2009; Olechnowicz & Jakowski, 2013).

En rebaños donde el conteo de células somáticas de la leche muestre valores superiores a 200 000/ml, es común la ocurrencia de retraso en la aparición e intensidad del celo después del parto (Morris *et al.*, 2013), especialmente en los climas cálidos.

En relación con el perfil endocrino, las variaciones más significativas asociadas a la ocurrencia de mastitis, inducida o natural, se caracterizan por el aumento del nivel de cortisol y la PGF2 α (Sugino, 2006). Además, ocurre una disminución de los niveles plasmáticos de la hormona del crecimiento y el factor de crecimiento IGF-I, los valores de T3 y T4 y se produce un aumento de la insulina, la hormona TSH y la Leptina (Rahman, 2010). También manifiesta cambios en el perfil de las hormonas del eje hipotálamo hipófisis-ovario que se expresa en la disminución en los patrones de secreción del factor de liberación hormonal GnRH, las gonadotropinas foliculo estimulante (FSH) y la foliculo luteinizante LH (Schrick *et al.*, 2001), así como los valores del estradiol. Estas transformaciones fisiopatológicas que acompañan a la mastitis son el origen de las modificaciones en la función ovárica, el útero, la fertilización, el crecimiento y desarrollo del embrión.

Efecto de la mastitis en las funciones ováricas y respuesta a los tratamiento de inducción y sincronización del estro

Existen evidencias experimentales que sustentan que la mastitis y los cambios sistémicos y endocrinos que la acompañan afectan las funciones ováricas. En estudios efectuados por Lavon *et al.* (2008) en un grupo de vacas Holstein, bajo un programa inseminación artificial mediante la sincronización del celo con CIDR + PGF2 α , fue inducida la ocurrencia de mastitis mediante la infusión infra-mamaria o venosa de endotoxinas (LPS) de la *Echerichia coli* en el momento de manifestación del estro. De acuerdo con los resultados del experimento, el tratamiento provocó un aumento de los niveles de cortisol, disminución y retraso de los pulsos de la LH, lo que generó un retardo de la ovulación en el 30% de las vacas tratadas. Aunque en ese estudio

no fueron identificados los factores individuales que condicionan este comportamiento, es factible creer que los cambios producidos estén relacionados con la magnitud de la respuesta inflamatoria individual (Lavon, Leitner, Voet & Wolfenson, 2010; Wolfenson, Leitner & Lavon, 2015).

En la práctica, estos hallazgos significan que las vacas afectadas de mastitis, asociada o no con otro proceso inflamatorio localizado fuera del tracto genital, tienen una menor probabilidad de ser fertilizadas posterior al celo natural o los tratamientos de sincronización del estro e inseminación artificial a tiempo fijo, debido a la falta de sincronización entre la aparición del estro y la ocurrencia o no de la ovulación.

Posteriormente Rahman (2010) evaluó la correlación existente entre la fertilidad y los cambios morfométricos y moleculares en el ovario de vacas afectadas de mastitis crónica. Mostró que la mastitis crónica provocó cambios significativos en el estroma ovárico, caracterizados estos por una disminución de la vascularización y el aumento de tejido fibroso, sin embargo, la enfermedad no afectó el número de folículos primordiales y primarios, aunque fue evidente una disminución significativa de la cifra de folículos secundarios. Este fenómeno fue atribuido al hallazgo de una reducción significativa ($p < 0,05$) en la expresión de la proteína GDF-9 dentro de los ovocitos preantrales y los folículos de diferentes tallas. Esta proteína estimula el reclutamiento, la proliferación y la diferenciación de las células de la teca, especialmente durante el tránsito de folículo primario a folículo secundario. El hecho de que en las vacas con mastitis crónica exista una carencia de esta proteína explica la inhibición del movimiento del folículo primario a folículo secundario (Rahman *et al.*, 2012).

Recientemente Morris *et al.* (2013) establecieron la relación entre el número de células somáticas en la leche y la respuesta al tratamiento de sincronización del celo con GnRH y PGF2 α . De acuerdo con los resultados de la investigación, no encontraron cambios significativos en la tasa de crecimiento y desarrollo del folículo ovárico,

así como modificaciones en el perfil de estradiol y progesterona después del tratamiento de sincronización; no obstante, observaron un mayor intervalo entre el final del tratamiento y la aparición del celo, el cual mostró una menor intensidad al ser comparado con vacas con < 200 000 células/ml. Uno de los aspectos de mayor relevancia de este estudio fue que en el 18% de las vacas tratadas con > de 200 000 células /ml), no produjo la ovulación.

Efecto de la mastitis en la competencia de los ovocitos para la maduración fertilización y desarrollo del embrión cultivado invitro

El mecanismo fisiopatológico mediante el cual la mastitis de origen infeccioso perturba las funciones ováricas o la calidad de los ovocitos aún no está plenamente aclarado, pero, de acuerdo con los estudios de Soto, Natzke y Hansen (2003) y Scenna (2006), la respuesta inmunitaria a la acción de los microorganismos participantes se acompaña del aumento de la síntesis y secreción de citoquinas (TNF- α , IFN- β , IL6, IL8, IL12), PGF2 α , el Factor de la Necrosis Tumoral (TNF. α) y el óxido nítrico por las células del endometrio, la glándula mamaria y las células del cúmulo en el folículo ovárico. Estos compuestos, liberados durante el proceso inflamatorio que sucede posterior a la infestación bacteriana, asociada

a la mastitis, disminuye significativamente el porcentaje de ovocitos madurados, fertilizados y desarrollados a blastocitos, así como la competencia de estos para la crio-conservación *in vitro* (Roth *et al.* 2013; Santos & Ribeiro, 2014) y es considerada una de las principales causas de mortalidad embrionaria.

Debido a que el mecanismo mediante el cual la PGF2 α afecta el crecimiento y desarrollo embrionario no estaba aclarado, investigadores de la Universidad de Tennessee, en EEUU, bajo la dirección del Dr. Neal Schrick, realizaron un conjunto de estudios para identificar el período del desarrollo embrionario en que se hace presente el receptor de PGF2 α , determinar la fase más susceptible al efecto nocivo de este compuesto y probar la contribución que pudiera hacer la inhibición del efecto negativo de PGF2 α al desarrollo embrionario durante el proceso de producción *in vitro* o *in vivo* de los embriones transferidos, después de ser tratados con un inhibidor de PGF2 α (Figuras 1, 2 y 3). En estos experimentos se identificó que la fase de mórula es la más susceptible a la acción de las PGF2 α (Scenna, 2006). La adicción de un inhibidor de las PGF2 α a los medios de fertilización *in vitro* contribuyó a mejorar la eficiencia de este proceso biotecnológico y la tasa de preñez con los embriones transferidos (Scenna, Edwards & Schrick, 2008).

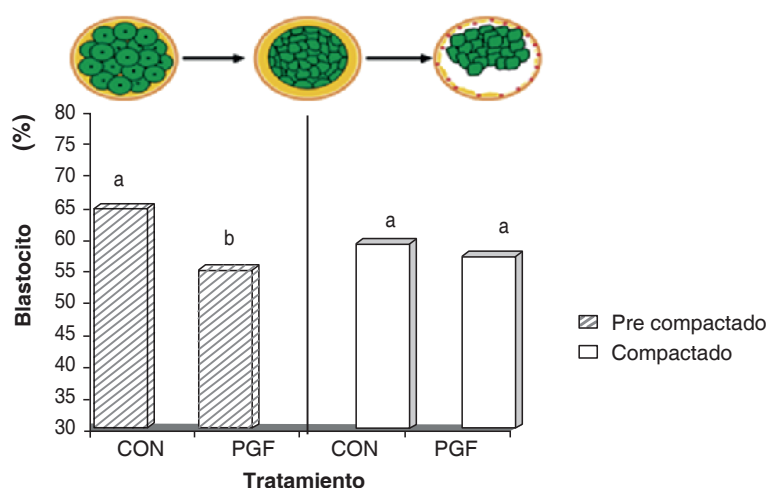


Figura 1. Desarrollo embrionario comparativo después de 48 horas en un medio conteniendo 1 ng /ml de PGF2 α (PGF) y un medio control (CON) (Adaptado de: Scenna,2006).
Leyenda: letras diferente por columna difieren entre si p<0.05

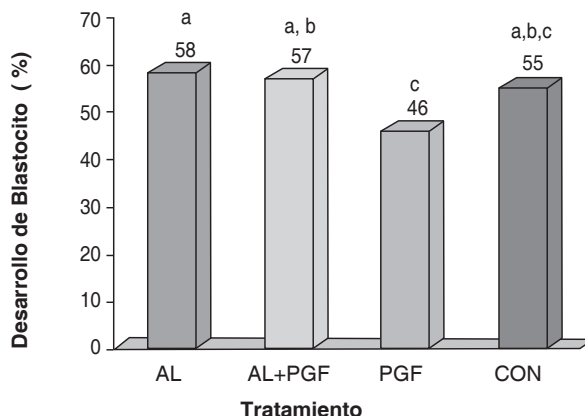


Figura 2. Desarrollo embrionario invitro de ovocitos obtenidos en un procesos de FIV en medios suplementados con un antagonista de PGF2-alfa y medios no suplementa: (Adaptado de .; Scenna, 2006). Leyenda: AL =AL-8810, PGF=PGF2-alfa; CON= control. Leyenda letras diferentes difieren entre sí $p < 0.05$

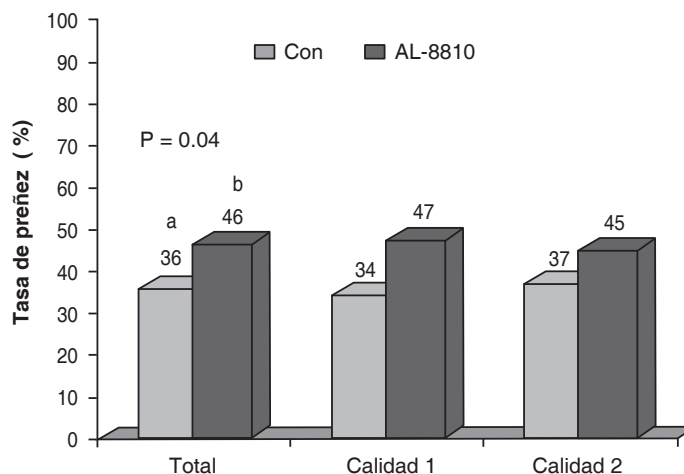


Figura 3. Tasa de preñez comparativa de embriones transferidos obtenidos durante el procesos de FIV en medio suplementado con un antagonista de PGF2-alfa (AL-8810) y un medio no suplementado (control). Leyenda: letras diferentes por columna difieren entre sí $p < 0.05$. Adaptado de : Scenna,2006)

En esta dirección, Glister Hatzirodos, Hummitzsch, Knight y Rodgers (2014) confirmaron que en el ovocito obtenido de vacas con mastitis, la acción de $TNF\alpha$ produce la inhibición de la producción de estradiol por las células de la granulosa y el bloqueo del proceso de maduración folicular. Desde el punto de vista molecular, observaron una reducción significativa de la expresión del Gen GDF-9, envuelto en el fenómeno de la diferenciación celular y el transcriptor 4CUCT-4 relacionado con la maduración (Roth *et al.*, 2013).

En similares investigaciones, Bromfield y Sheldon (2013), durante tres años, evaluaron la capacidad de respuesta inmunológica de las células de la granulosa al inicio de un proceso inflamatorio de origen infeccioso en la glándula mamaria. También determinaron el efecto subsiguiente en el desarrollo de los folículos primordiales *in vivo* y del ovocito durante el proceso de maduración *in vitro*. Sus resultados mostraron que las células de la granulosa, ante un proceso pre-inflamatorio ocasionado por las endotoxinas de la *Echerichia coli* (LPS), aumentaron la síntesis y acumulación

de citoquinas IL-6, y quimoquinas IL8 en el licor folicular y que su magnitud depende de la dosis de endotoxinas presente. Estas sustancias inhibieron en la célula del folículo primordial la expresión del gen Supresor Tumoral de la fosfatasa (PTEN) y su transcriptor (FOXO3), responsables del desarrollo ulterior de los folículos primordiales.

Posteriormente, Price, Bronfield y Sheldon (2013), así como Magata, Horiuchi, Miyamoto y Shimizu (2014) confirmaron que el ovocito recolectado de vacas afectadas con mastitis inducida por gérmenes gram negativo, mostraron una interrupción de la expansión de las células del complejo cúmulo-ovocito, el proceso de meiosis y la ocurrencia de la división en la vesícula germinal durante la fase de maduración *in vitro*. Además, los blastocistos obtenidos tuvieron un mayor número de células con apoptosis en relación con los blastocistos provenientes de vacas no afectadas por la enfermedad. También observaron alteraciones en la expresión de los genes COX2, POU5F1 y HSF materno, asociados a la respuesta anti-inflamatoria (Asaf *et al.*, 2013). Por consiguiente, ocurre un aumento de la respuesta inflamatoria caracterizada por el incremento de la temperatura corporal y la síntesis y secreción de los mediadores moleculares y celulares de la inflamación, que inhiben el proceso de maduración y desarrollo del ovúlo (Roth, 2015; Das *et al.*, 2016).

Un ejemplo de lo antes expuesto fue informado en un estudio previo desarrollado por Roth *et al.* (2013), quienes evaluaron la relación entre el número de células somáticas en la leche de vacas afectadas de mastitis y la competencia para el desarrollo de ovocitos fertilizados y cultivados *in vitro*. Encontraron que, independientemente del tipo de bacteria que se vincula al proceso inflamatorio, las vacas en las que se halló un número medio (311 000) o alto (813 000) de células somáticas por mililitro en la leche, después del procesos de maduración y fertilización *in vitro*, mostraron un número menor óvulos que completaron su desarrollo a blastocisto (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de la mastitis en la competencia de los ovocitos para la fertilización y desarrollo *in vitro* (Adaptado de Roth *et al.*, 2013)

Número de células somáticas en la leche por mililitro	Blastocisto (%)
148 000	18,1± 4,6
311 000	5,6±2,3
1 813 000	4,1±1,8

Estos hallazgos experimentales demuestran, en primer lugar, que aunque es posible producir embriones mediante la técnica de fertilización *in vitro* con ovocitos provenientes de vacas altas productoras, desechadas y destinadas al sacrificio, la tasa de blastocistos obtenida es baja en aquellas que fueron dadas de baja por mastitis. En segundo lugar, que los procesos inflamatorios fuera del tracto reproductor pueden afectar la fertilidad y eficiencia de las tecnologías de reproducción asistida (Santos & Ribeiro, 2014; Ribeiro *et al.*, 2016), por consiguiente, sería necesario desarrollar estrategias para modificar el proceso de fertilización y cultivo de embriones *in vitro*, con el fin de lograr la expresión adecuada de muchos genes implicados en la maduración, fertilización, crecimiento y desarrollo del ovocito.

Efecto de la mastitis en la reserva de los folículos ováricos de la madre y las crías

El desarrollo del folículo ovárico es objeto de múltiples estudios. Recientemente se realizaron diversas investigaciones para conocer cómo la mastitis y el proceso inflamatorio que le acompaña, afectan la reserva de los folículos ováricos de la madre y su descendencia (Ireland *et al.*, 2008), así como valorar el impacto en la competencia para el desarrollo de las nuevas biotecnologías de la reproducción. Existen evidencias experimentales que señalan, durante la preñez, el impacto de las enfermedades inflamatorias sobre el desarrollo ovárico de la descendencia. Así, Evans *et al.* (2012) señalaron en un reciente estudio, usando como marcador biológico la hormona Anti-Mulleriana, que cuando

el número de células somáticas en la leche supera el valor de 200 000/ ml durante la preñez, se producen hijas con bajo nivel de hormona Anti-Mulleriana. Esta hormona se produce por las células de la granulosa en los folículos en fase de crecimiento y tiene una alta correlación con las reservas de los folículos ováricos (Ireland *et al.*, 2010).

Al respecto, en una investigación efectuada por Ireland *et al.* (2008), se tomaron dos grupos de novillas provenientes de vacas Holstein con > 200 000 o <200 000 células somáticas por mililitro en la leche durante toda la gestación. En esta pesquisa se comprobó que las novillas provenientes de vacas afectadas de mastitis subclínica, tuvieron un nivel de hormona Anti-Mulleriana, un 50% inferior que las novillas engendradas por vacas sanas. Este resultado implica que las infecciones crónicas durante la preñez de las vacas lecheras, disminuyen las reservas potenciales de folículos ováricos. En este sentido, se ha demostrado en varios estudios que las novillas con menor reserva de folículos ováricos tuvieron una tasa inferior de preñez (Cushman *et al.*, 2009), mayor porcentaje de mortalidad embrionaria (Jimenez-Krassel *et al.*, 2009), menor capacidad de respuesta al tratamiento de superovulación (Sing, Domínguez, Jaiswal & Adams, 2004; Ireland *et al.*, 2008) y afectaciones en el proceso de diferenciación y maduración del ovocito (Beker-van Woudenberg *et al.*, 2004; Ireland *et al.*, 2009) en comparación con las novillas que mostraron una mayor reserva de folículos ováricos.

Uno de los hallazgos experimentales de mayor significación sobre este tema fue expuesto por Sominsky *et al.* (2013), quienes demostraron en rata hembra que la exposición neonatal a un desafío inmune mediante la administración de LPS, se tradujo en un desarrollo reproductivo alterado. En concreto, los animales tratados con LPS mostraron una reserva de folículos ováricos disminuida y vida reproductiva alterada. En ese estudio se examinaron los mecanismos celulares que conducen a la ovulación y la reserva de folículos primordiales del ovario. Las ratas a las

que se administró por vía intra-peritoneal LPS (*Salmonella enteritidis*), mostraron un incremento significativo en la expresión del receptor de tipo TLR4 y una disminución significativa de las reservas de folículos primordiales de los ovarios en el neonato.

Empleando similar diseño experimental en el ganado bovino, Ireland *et al.* (2011) y los trabajos recientes de Bromfield y Sheldon (2013), en la Universidad de Missouri, confirmaron que las crías provenientes de vacas con mastitis crónica, durante la gestación mostraron una menor talla de los ovarios, además de una disminución de la reserva de folículos ováricos y un nivel más bajo de la hormona Anti-Mulleriana (AMH).

En este contexto, puesto que existen sobradas evidencias que prueban que la cantidad reserva de ovocito en el ovario está asociada con la fertilidad de las hembras bovinas (Evans *et al.*, 2012), es posible afirmar que las crías provenientes de vacas afectadas de mastitis durante el período de la embriogénesis y desarrollo fetal, tienen bajo potencial reproductivo y pueden manifestar una menor eficiencia frente a las nuevas biotecnologías reproductivas. Estas derivaciones aluden a que la activación del sistema inmune en los primeros días de vida, puede tener implicaciones significativas para la programación del desarrollo de los ovarios y la fertilidad potencial de las crías (González-Recio, Ugarte & Bach, 2012). Esto sugiere que las novillas descendientes de vacas con mastitis crónica pueden contribuir a disminuir la eficiencia de las técnicas de reproducción asistida.

Con base a lo expresado, dado que no existe información sobre el impacto de la concurrencia de mastitis en la madre durante la embriogénesis y desarrollo fetal, y el comportamiento reproductivo de su descendencia, sería necesario orientar investigaciones en este sentido especialmente en aquellas regiones donde coexiste una elevada prevalencia de la enfermedad de la glándula mamaria.

Mecanismo fisiopatológico del efecto de la mastitis en la fertilidad y eficiencia de las biotecnologías de reproducción asistida

En resumen aunque aún no está plenamente determinado el mecanismo que provoca la disminución de la fertilidad y eficiencia de las tecnologías de reproducción asistida en las vacas afectadas de mastitis, Hertl *et al.* (2010) afirman que, cuando ocurre la mastitis 14 días antes o 35 días después de la inseminación artificial, se reduce significativamente la probabilidad de concepción. Lavon *et al.* (2010) explican que esta manifestación de infertilidad se debe a un alargamiento del intervalo estro-ovulación, en tanto que Moore *et al.* (2005) sugieren que es el producto fallas en la fertilización. Sin embargo, Perrin *et al.* (2007) y Ahmadzadeh *et al.* (2009) aseguran que la causa radica en las pérdidas embrionarias.

sustentan que la infusión de microorganismos gram positivos o gram negativos en el endometrio u otro órgano fuera del aparato genital puede producir una respuesta inmunológica al proceso inflamatorio en las células de la granulosa, lo que provoca la inhibición de la expresión de algunos genes (Asaf *et al.*, 2013; Bromfield & Sheldon, 2013) implicados en la diferenciación celular, el crecimiento y desarrollo del folículo ovárico (Chebel, 2007; Herath *et al.*, 2007; Rahman *et al.*, 2012) y la maduración del ovocito (Bromfield & Sheldon, 2013). In vivo puede ser la causa de ciclos anovulatorios (Williams *et al.*, 2008; Lavon *et al.*, 2010) y la disminución de la capacidad de implantación del embrión. También puede originar una mortalidad embrionaria (Hansen, 2007; Jackson, Lauren, Har & Wisnat, 2012). In vitro, constituye una razón para el fracaso de los procesos de maduración, fertilización, crecimiento y desarrollo del embrión (Soto *et al.*, 2003; Scenna, 2006; Roth, 2015). Un resumen de los antes expuesto es mostrado en la (Figura 4).

Existen suficientes evidencias experimentales que

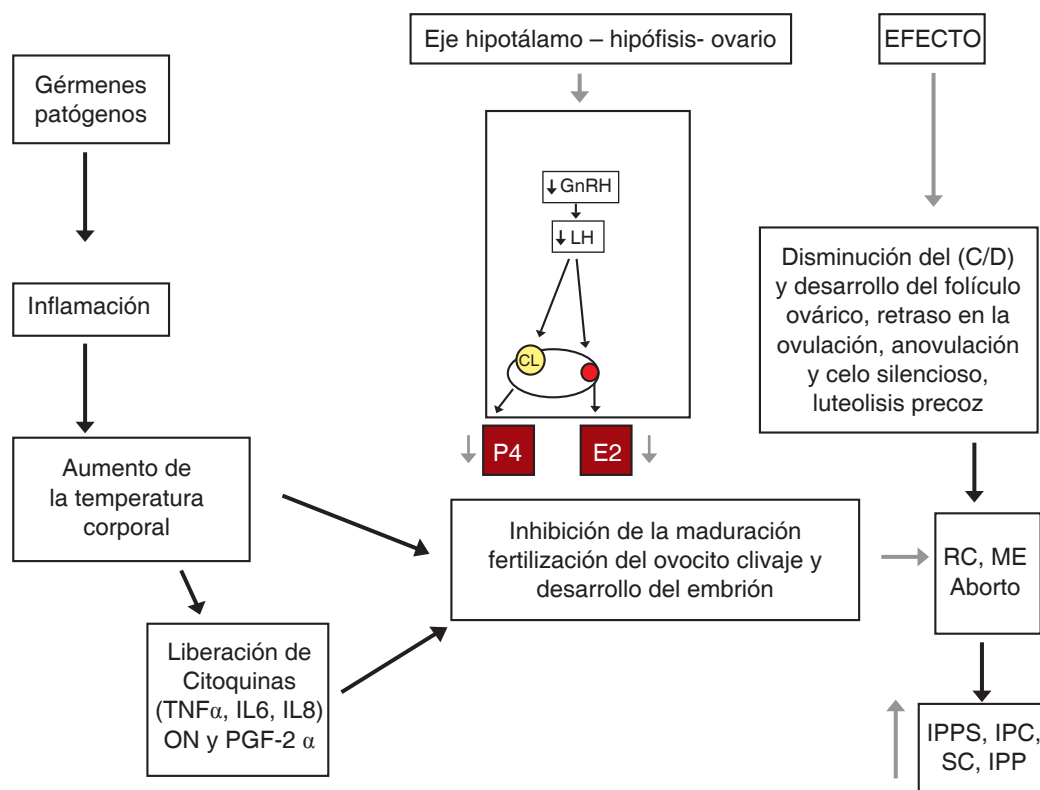


Figura 4. Esquema del mecanismo fisiopatológico del efecto de la mastitis en la reproducción (Adaptado de: Hansen, Soto & Natzke, 2004; Chebel,2007).

No obstante, aún es insuficiente el conocimiento sobre la competencia a la crioconservación de los blastocistos obtenidos durante el proceso de fertilización *in vitro* y la respuesta a los tratamientos superovulatorios en la clásica transferencia de embriones, especialmente en los países de climas cálidos. En este sentido, puesto que en el trópico existe una elevada prevalencia de esta enfermedad (Ruiz, Peña, González & Ponce, 2013; Torres *et al.*, 2016), sería de interés evaluar su efecto en el comportamiento reproductivo y eficacia de las tecnologías de reproducción asistida, con énfasis en la producción *in vitro* de embriones en el ganado productor de leche, criado en pastoreo bajo las condiciones climáticas del trópico.

Estrategias de control, prevención y tratamiento para mejorar la fertilidad y la eficiencia de las biotecnologías reproductivas en vacas afectadas de mastitis

Tradicionalmente, el control y la prevención de la mastitis comprende: la identificación y tratamiento de los casos clínicos, la terapéutica con antibióticos en las vacas secas (Petrovski, 2011; Bogni *et al.*, 2011; Branko *et al.*, 2012; More, Clegg & Grady, 2012), la desinfección de las tetas posterior al ordeño (Kruze, 2008), la vacunación (Wilson *et al.*, 2008), la eliminación de las vacas con infecciones crónicas (Garmo *et al.*, 2010) y el mantenimiento rutinario, igual que desinfección de la ubre y las máquinas (Jansen, Renes & Lam, 2010; Lam, 2010).

El riesgo que tienen las vacas para desarrollar mastitis está determinado, en primera, por la cantidad de patógenos presentes en el conducto mamario y la habilidad del animal para prevenir la infección. La nutrición también tiene un efecto directo en el estado del sistema inmunitario de la vaca, por lo tanto, representa una influencia indirecta con la tasa de infección y severidad de la mastitis (O'Rourke, 2009).

Una de las técnicas de manejo disponible para reducir la incidencia de esta enfermedad fue expuesta en Chile por Risco (2009), quien

evaluó, al inicio de la lactancia, el efecto de la duración del período seco en la tasa de ocurrencia de mastitis y su asociación con el comportamiento reproductivo. Según los datos de esta investigación, cuando se incrementó la duración del periodo seco, aumentó la presencia de mastitis y se observó un peor comportamiento reproductivo de las vacas lecheras.

En esta dirección, aunque tradicionalmente se considera que 60 días es el tiempo óptimo de duración del periodo seco, después de numerosas investigaciones se comprobó que acortar esta fase del ciclo reproductivo a 30 o 35 días es una adecuada estrategia para facilitar el desarrollo normal del período de transición en las vacas (Grummer, Wiltbank, Fricke, Watters & Silva-Río, 2010), sin que se afecte la incidencia de mastitis en la siguiente lactación (Pinedo, Risco & Melendez, 2011; Collier, Annen-Dawson & Pezeshki, 2012), con lo cual se logra mejorar los indicadores reproductivos (Santschi & Lefebvre, 2014).

De acuerdo con el National Mastitis Council (2009), los requerimientos nutricionales necesarios para optimizar la capacidad funcional del sistema inmunitario de las vacas durante el período de transición debe ir orientado a: el mantenimiento del estado de la condición corporal al inicio de la lactancia; prevenir la hipocalcemia posparto y proveer un adecuado nivel de minerales trazas (Cu, Se, Zn, Mn y Fe y las vitaminas E y A y el Beta-caroteno) (Van Ryn, 2009; Ceballos -Marquez, 2010). Estas estrategias, con énfasis en la suplementación de micro nutrientes, tiene una gran importancia en aquellos rebaños donde se conoce la existencia de carencias de estos componentes de la dieta (Spears & Weiss, 2008; Davidov, Rodinovic, Erdelfan, Stoncic & Belic, 2012; Bhandari Garg & Sheriasa, 2013). Este procedimiento ha demostrado ser eficiente para mejorar el mecanismo de defensa inmunológico de las vacas durante el período de transición y disminuir la prevalencia y severidad de la mastitis en la etapa posterior al parto (Enjalbert, Lebreton & Salat, 2006; Torres *et al.*, 2016).

Con respecto a las técnicas de control reproductivo mediante métodos biotécnicos, las investigaciones se han orientado hacia el control del celo, la ovulación (Thatcher *et al.*, 2006; Pedroso, 2011) y el sostenimiento de la preñez en la fase posterior a la inseminación o la transferencia de embriones (Jerome & Srivastava, 2012). En este sentido, se ha propuesto el uso de drogas antiinflamatorias, no esteroidal, (Farney *et al.*, 2013); la vacunación contra el Lipopolisacárido (LPS) de la *Echerichia coli* (Zebeli, Mansmann, Sivaraman, Dunn & Ametaj, 2013), y la suplementación de ácidos grasos polisaturados, conjugados con calcio, con el fin modular y bloquear la biosíntesis de moléculas proinflamatorias (citoquinas y la prostaglandina F2-alfa) que acompañan al proceso inflamatorio provocado por los gérmenes infecciosos (Greco *et al.*, 2013; Bertoni, Minute & Trevisi, 2015), así como mejorar la respuesta inmunitaria durante el período de transición (Risco, 2009).

Otras investigaciones están encaminadas a mejorar los métodos de fertilización *in vitro* teniendo en cuenta los cambios que ocurren a nivel molecular. Por consiguiente, se han introducido diversas modificaciones a los medios de maduración, fertilización y desarrollo embrionario durante el proceso de producción *in vitro* de embriones (Scenna, 2006; Block, Bonilla & Hansen, 2010; National Mastitis Council, 2012). Así, en algunos experimentos se ha evaluado el efecto de la adición de antioxidantes y los inhibidores de la acción de la PGF2 α y el Factor de la Necrosis Tumoral (Yang & Fortune, 2007; Scenna *et al.*, 2008) en la eficiencia del proceso de obtención *in vitro* de embriones en el trópico.

Al respecto, Deb *et al.* (2011) comprobaron que al adicionar ácido 9-cisretinoico a los medios de maduración y cultivo *in vitro* de embriones bovinos, se inhibe la expresión del gen de TNF α por las células de la granulosa, alcanzando un aumento significativo del número de blastocistos desarrollados y un menor número de células con apoptosis. Estos hallazgos experimentales han permitido desarrollar nuevas estrategias para inhibir el efecto negativo del TNF α producido

por las células de la granulosa en los ovocitos obtenidos de vacas con mastitis.

Más tarde, Jackson *et al.* (2012) enfatizan que el aumento de síntesis y secreción del Factor de la Necrosis Tumoral (TNF α), que ocurre en las vacas afectadas de mastitis, ejercen un efecto inhibitorio en el crecimiento y desarrollo embrionario. Además comprobaron que esta acción es mediada por la acción de la prostaglandina F2-alfa. En experimentos orientados a probar esta hipótesis, comprobaron que los ovocitos madurados, fertilizados y cultivados *in vitro*, en los que se adicionó a los medios endometacina un inhibidor de la prostaglandina F2-alfa, se pudo bloquear la acción nociva que ejerce la PGF2 α en el proceso de desarrollo embrionario y mejorar la tasa de maduración de los embriones cultivados *in vitro*. Similares resultados fueron informados por Kim *et al.* (2014), quienes adicionaron a los medios de cultivo (Flunixin-Meglumine) un inhibidor no esteroideales de las PGF2-alfa.

Temas de investigación

- Evaluar los factores de riesgo en la prevalencia de la mastitis bajo diferentes ambientes y sistemas de manejo en las vacas lecheras y de doble propósito en pastoreo, en clima tropical.
- Determinar la relación entre la ocurrencia de mastitis, el comportamiento reproductivo y eficiencia de las técnicas de reproducción asistida en las condiciones del trópico
- Desarrollar nuevas alternativas de manejo reproductivo, nutrición suplementaria y métodos biotécnicos para mejorar la fertilidad y la eficiencia de la transferencia y producción *in vitro* de embriones en hembras bovinas afectadas de mastitis en pastoreo y clima tropical
- Identificar mediante técnicas moleculares los agentes infecciosos que están vinculados al desarrollo de mastitis persistente y la resistencia genética de las vacas a diferentes patógenos de la glándula mamaria.

- Conocer la relación entre la ocurrencia de mastitis en la madre durante la gestación y la fertilidad de las hijas y su respuesta a la implementación de las técnicas de reproducción asistida.
- Valorar el costo total de la ocurrencia de mastitis en todos los sectores de la ganadería vacuna; conocer la aptitud y motivación de los productores para la prevención y control de la mastitis.

Conclusiones

La mastitis es una enfermedad de las glándulas mamarias que ocasiona grandes pérdidas económicas a la industria láctea; además existen varias evidencias experimentales de su relación con el comportamiento reproductivo del ganado vacuno. La ocurrencia de mastitis está asociada al aumento del intervalo entre partos, número de servicios por gestación, anestro, mortalidad embrionaria y abortos. En la mayoría de países subdesarrollados o en vías de desarrollo, tiene una prevalencia superior al 50% en los hatos productores de leche, respecto a la cual existen algunos informes de las pérdidas ocasionadas por la mastitis en la producción y calidad de la leche vacuna.

No hay información del impacto que puede ejercer esta enfermedad en la eficiencia de las biotecnologías de la reproducción asistida y la fertilidad de las hijas provenientes de madres afectada de mastitis crónica durante la gestación en el trópico. Las medidas preventivas están encaminadas al control y prevención de la mastitis, y se pone especial énfasis en el aumento de la capacidad de respuesta del sistema inmunológico mediante la suplementación de grasa, y micronutrientes, con atención en aquellos de acción antioxidante. Aunque los resultados son inconsistentes, existen evidencias que en áreas carenciales de micro nutrientes ejercen un efecto beneficioso. Se reconoce el impacto que esta dolencia produce en la eficiencia de tecnologías de reproductivas asistida, por lo tanto, dado el auge que toma el uso de estas técnicas, sería útil

desarrollar investigaciones sobre esta temática en las hembras criadas en pastoreo bajo las condiciones del trópico.

Referencias bibliográficas

- Ahmadzadeh, A., Frago, F., Shafii, B., Dalton, J. C., Price, W.J., & McGuire, M. A. (2009). Effect of clinical mastitis and other diseases on reproductive performance of Holstein cows. *Animal reproduction science*, 112(3), 273-282.
- Asaf, S., Leitner, G., Furman, O., Lavon, Y., Kalo, D., Wolfenson, D., & Roth, Z. (2014). Effects of *Escherichia coli*-and *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in lactating cows on oocyte developmental competence. *Reproduction*, 147(1), 33-43.
- Ballou, M.A. (2012). Growth and development symposium: inflammation: role in the etiology and pathophysiology of clinical mastitis in dairy cows. *Journal of animal science*, 90(5), 1466-1478.
- Bar, D., Tauer, L.W., Bennett, G., Gonzalez, R.N., Hertl, J.A., Schukken, Y.H., Schulte, H.F., Welcome, F.L. & Gröhn, Y.T. (2008). The Cost of Generic Clinical Mastitis in Dairy Cows as Estimated by Using Dynamic Programming. *Journal of Dairy Science* 91: 2205-2214.
- Beker-van Woudenberg, A.R., van Tol, H.T., Roelen, B.A., Colenbrander, B., & Bevers, M.M. (2004). Estradiol and its membrane-impermeable conjugate (estradiol-bovine serum albumin) during in vitro maturation of bovine oocytes: effects on nuclear and cytoplasmic maturation, cytoskeleton, and embryo quality. *Biology of reproduction*, 70(5), 1465-1474.
- Bertoni, G., Minute, A., & Trevisi, E.(2015). Immune system , inflammation and nutrition in dairy cattle. *Animal Production Science*, 55(7), 943-948. <http://dx.doi.org/101071/AN14863>.
- Bhanderi, B.M., Garg, M.R., Sherasia, P.L. (2013). Effect of supplementing chelated trace minerals and coated vitamins on the incidences of sub-clinical and clinical

- mastitis in dairy cows. *Livestock research for Rural Development*, 25(4), 3-5.
- Block, J., Bonilla, L., & Hansen, P.J. (2010). Efficacy of in vitro embryo transfer in lactating dairy cows using fresh or vitrified embryos produced in a novel embryo culture medium. *Journal of dairy science*, 93(11), 5234-5242.
- Bogni, C., Odierno, L., Raspanti, C., Giraudo, J., Larriestra, A., Reinoso, E., Lasagno, M., Ferrari, M., Ducrós, E., Frigerio, C., Bettera S., Pellegrino, M., Frola, I., Dieser, S., Vissio, C. (2011). War against mastitis: Current concepts on controlling bovine mastitis pathogens. En Méndez-Vilas A. (Ed.). *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances* (pp. 483-494). Formatex.
- Branko, A., Ljupco, M., Ljupco, A., Martin, N., Ratkova M., Dean, J., Kiro, P., & Toni, D. (2012). Implementation of strategies for mastitis control in Macedonia: a case report. *Macedonian Veterinary Review*, 35(2), 87-90.
- Bromfield, J.J., & Sheldon, I.M. (2013). Lipopolysaccharide reduces the primordial follicle pool in the bovine ovarian cortex ex vivo and in the murine ovary in vivo. *Biology of reproduction*, 88(4), 98.
- Ceballos-Marquez, A., Barkema, H.W., Stryhn, H., Wichtel, J. J., Neumann, J., Mella, A., Kruze, J., Espindola M.S., & Wittwer, F. (2010). The effect of selenium supplementation before calving on early-lactation udder health in pastured dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 93(10), 4602-4612.
- Cha, E., Hertl, J.A., Schukken, Y.H., Tauer, L.W., Welcome, F.L., & Gröhn, Y. T. (2013). The effect of repeated episodes of bacteria-specific clinical mastitis on mortality and culling in Holstein dairy cows. *Journal of dairy science*, 96(8), 4993-5007.
- Chebel, R.C. (2007). Mastitis effects on reproduction. *NMC Regional Meeting Proceedings*, 43-55. Recuperado de <http://www.agweb.com/assets/import/files/repro.pdf>
- Collier, R. J., Annen-Dawson, E. L., & Pezeshki, A. (2012). Effects of continuous lactation and short dry periods on mammary function and animal health. *Animal*, 6(3), 403-414.
- Cushman, R. A., Allan, M. F., Kuehn, L. A., Snelling, W. M., Cupp, A. S., & Freetly, H. C. (2009). Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef cows: Investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight. *Journal of animal science*, 87(6), 1971-1980.
- Das, R., Sailo, L., Verma, N., Bharti, P., & Saikia, J. (2016). Impact of heat stress on health and performance of dairy animals: A review. *Veterinary world*, 9(3), 260-268.
- Davidov, I., Radinović, M., Erdeljan, M., Cincović, M. R., Stančić, I., & Belić, B. (2013). Relations between blood Zinc concentrations and udder health in dairy cows. *Rev Méd Vét*, 164(4), 183-190.
- Deb, G.H., Dey, S.R., Bang, J.I., Cho, G.J., Park, H.C., Lee, J.G., & Kong, I.K. (2011). 9-cisretinoic acid improvement development competence and embryo quality during in vitro maturation of bovine oocyte through the inhibition of oocyte tumor necrosis factor α gene expression. *J. Anim Sci*, 89(9), 2759-2767.
- Enjalbert, F., Lebreton, P., & Salat, O. (2006). Effects of copper, zinc and selenium status on performance and health in commercial dairy and beef herds, retrospective study. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 90(11-12), 459-466.
- Evans, A.C.O., Mossa, F., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.L.H., Smith, G.W., & Ireland, J.J.L. (2012). Effects of Maternal Environment During Gestation on Ovarian Folliculogenesis and Consequences for Fertility in Bovine Offspring. *Reproduction in domestic animals*, 47(4), 31-37.
- Fabian, D., Bystriansky, J., Čikoš, Š., Bukovská, A., Burkuš, J., & Koppel, J. (2010). The effect on preimplantation embryo development of non-specific inflammation localized outside the reproductive tract. *Theriogenology*, 74(9), 1652-1660.
- Farney, J.K., Mamedova, L. K., Coetzee, J.F., KuKanich, B., Sordillo, L.M., Stoakes, S.K., Minton, J. E., Hollis, L.C., & Bradford, B.

- J. (2013). Anti-inflammatory salicylate treatment alters the metabolic adaptations to lactation in dairy cattle. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 305(2), 110-117.
- Fodor, I., Dunay, A., Ózsvári, L. (2013). Economic losses due to mastitis and reproductive failures in Hungarian large-scale Holstein-Friesian dairy herds. Business Management. *Practice and Theory in the 21st Century*. International Scientific Conference, Nitra, Slovakia.
- Garmo, R. T., Waage, S., Sviland, S., Henriksen, B. I., Østerås, O., & Reksen, O. (2010). Reproductive performance, udder health, and antibiotic resistance in mastitis bacteria isolated from Norwegian Red cows in conventional and organic farming. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52(1), 1.
- Glister, C., Hatzirodos, N., Hummitzsch, K., Knight, P. G., & Rodgers, R. J. (2014). The global effect of follicle-stimulating hormone and tumour necrosis factor α on gene expression in cultured bovine ovarian granulosa cells. *BMC genomics*, 15(1) DOI: 10.1186/1471-2164-15-7. Recuperado de <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-15-72>
- Gómez-Cifuentes, C. I., Molinet, A. I., Signorini, M. L., Scandelo, D., & Calvinlio, L.F. (2014). The association between mastitis and reproductive performance in seasonal calve dairy cows management on a pasture system. *Arch Med Vet*, 46, 197-206.
28. González-Recio, O., Ugarte, E.B., & Bach, A. (2012). Trans generational effect of maternal lactation during pregnancy: A Holstein cows model. *PLoS One* 7(12), e51816
- Greco, L.F., Neto, J.N., Pedrico, A., Ferrazza, R.A., Lima, F.S., Bisinotto, R.S., Martínez, N., García, M., Ribeiro, E.S., Gomes, G.C., Shin, J.H., Ballon, M.A., Thatcher, W.W., Staples, C.R., & Santos, E.P. (2015). Effects of altering the ratio of dietary n-6 to n-3 fatty acids on performance and inflammatory responses to a lipopolysaccharide challenge in lactating Holstein cows. *Journal of dairy science*, 98(1), 602-617
- Grummer, R. R., Wiltbank, M. C., Fricke, P. M., Watters, R. D., & Silva-Del-Rio, N. (2010). Management of dry and transition cows to improve energy balance and reproduction. *Journal of Reproduction and Development*, 56, 22-28.
- Gunay, A., & Gunay, U. (2008). Effect of clinical mastitis on reproduction performance in Holstein cows. *Acta. Vet. Brno.*, 77(4), 555-560.
- Hansen, P. J. (2009). Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1534), 3341-3350.
- Hansen, P. J. (2007). Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevated temperature to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress. *Theriogenology*, 68, 242-249. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.008>
- Hansen, P., Soto, P., Natzke, R. (2004). Mastitis and fertility in cattle -possible involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality. *Am J. Reprod Immunol*, 51, 294 -301.
- Herath, S., Williams, E. J., Lilly, S. T., Gilbert, R. O., Dobson, H., Bryant, C. E., & Sheldon, I. M. (2007). Ovarian follicular cells have innate immune capabilities that modulate their endocrine function. *Reproduction*, 134(5), 683-693.
- Hertl, J.A., Gröhn, Y.T, Leach, L.W, Bar, D, Bennet, G.J, González, R.N, Rauch, B.J, Welcome, F.L, Tauer, L.W, & Schukken, Y.H. (2010). Effects of clinical mastitis caused by gram-positive and gram-negative bacteria and other organisms on the probability of conception in New York State Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93, 1551-1560.
- Hudson, C. D., Bradley, A. J., Breen, J. E., & Green, M. J. (2012). Associations between udder health and reproductive performance in United Kingdom dairy cows. *Journal of dairy science*, 95(7), 3683-3697.
- Huszenicza, G., Janosi, S., Kulcsar, M., Korodi, P., Reiczigel, J., Katai, L., Peters, A.R., & de Rensis F. (2005). Effects of clinical mastitis

- on ovarian function in post-partum dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 40(3), 199-204.
- Ireland, J.J., Smith, G.W., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Folger, J.K., Ireland, J.L.H., Mossa, F., Lonergan, P., Evans, A.C.O. (2011). Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Mullerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 23(1), 1–14.
- Ireland, J.J.; Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Folger, J. K., Smith, G. W., Mossa, F., & Evans, A.C.O. (2010). *Evidence that mammary gland infection /injury during for study of reproduction in dairy cows may have a negative impact on size of the ovarian reserve in their daughters*. 3rd Annual Meeting for the society . Milwaukee. WI. EUA.
- Ireland, J. J., Zielak, A. F., Jimenez-Krassel, F., Folger, J. Bettogowda, A., Scheetz, D., Walsh, S., Mossa, F., Knight, P.G., Smith, G.W., Lonergan, P., & Evans, A.C.O. A.C.O.(2009). Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular estradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in cattle. *Biology of reproduction*, 80(5), 954-964.
- Ireland, J.J., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Themmen, A.P, Ward, F., Lonergan, P. Smith, G. W., Perez, G. I., Evans, A.C., Ireland, J. J. (2008). Antral Follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocyte and follicles in ovaries of young adult cattle . *Biology of reproduction*, 79(6), 1219-1225.
- Jackson, L. R., Char, E.F., & Whisnat, S. (2012). Tumor necrosis factor alpha inhibits in-vitro bovine embryo development through a prostaglandin mediate mechanism. *Journal Animal Science and Biotechnology*. 3(1), 7-10.
- Jansen, J., Renes, R.J., & Lam, T.J. (2010). Evaluation of two communication strategies to improve udder health management. *J. Dairy Sci.* 93(2), 604–612.
- Jerome, A., & Srivastava, N. (2012). Prostaglandins vis-à-vis bovine embryonic mortality: a review. *Asian Pacific Journal of Reproduction* 1(3), 238-246.
- Jimenez-Krassel, F., Folger, J., Ireland, J. L. H., Smith, G.W., Hou, X., Davis, J. S., Lonergan, P., & Evans, A.C.O. (2009). Evidence high variation in ovarian reserve of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during reproductive cycle of single – ovulation species. *Biology of reproduction*, 80(6), 1272-1281.
- Jóźwik, A., Krzyżewski, J., Strzałkowska, N., Poławska, E., Bagnicka, E., Wierzbička, A., Niemczuk, K., Lipińska, P., & Horbańczuk, J.O.(2012). Relations between the oxidative status, mastitis, milk quality and disorders of reproductive functions in dairy cows - a review. *Animal Science Papers and Reports* 30(4), 297-307.
- Juozaityene, V., & Juozaitis, A. (2005). The influence of somatic cell count in milk on reproductive traits and production of Black-and-White cows. *Veterinarski arhiv*, 75(5), 407.
- Kim, S.S., Bang, J., Fakruzzaman, M., Lee, K., Ko, D. H., Ghamen, N., Wang, Z., & Kong, I. K. (2014). Effect of flunixin meglumine and prostaglandin F2 α on the development and quality of bovine embryos in vitro. *Reprod. Dom. Anim.* 49(6), 957-963.
- Konig, S., Hubner, G., Sharifi, R., Bohlsen, E., Detterer, J., Simianer, H., & Holtz, W. (2006). Relation between the somatic cell count and the success of first insemination in East Frisian dairy herds on the basis of logistic models analysis. *Zuchungskunde*, 78(2), 90-101.
- Kruze, J. (1998). La rutina de ordeño y su rol en los programas de control de mastitis bovina. *Archivos de medicina veterinaria*, 30(2), 07-16.
- Lam, T.J. (2010). On Farm Udder Health Programs, WCDS. *Advances in Dairy Tech.* 22, 309-32.
- Lavon, Y., Leitner, G., Voet, H., & Wolfenson,

- D. (2010). Naturally occurring mastitis effects on timing of ovulation, steroid and gonadotrophic hormone concentrations, and follicular and luteal growth in cows. *Journal of dairy science*, 93(3), 911-921.
- Lavon, Y., Leitner, G., Goshen, T., Braw-Tal, R., Jacoby, S., & Wolfenson, D. (2008). Exposure to endotoxin during estrus alters the timing of ovulation and hormonal concentrations in cows. *Theriogenology*, 70(6), 956-967.
- Magata, F., Horiuchi, M., Miyamoto, A., & Shimizu, T. (2014). Lipopolysaccharide (LPS) inhibits steroid production in theca cells of bovine follicles in vitro: distinct effect of LPS on theca cell function in pre- and post-selection follicles. *The Journal of reproduction and development*, 60(4), 280.
- McDowell, L.R. (2005). Minerales para rumiantes en pastoreo en regiones tropicales. Dep. Zoot. Universidad de la Florida. Gainesville. USA. IFAS.
- McDougall, S., Rhodes, F. M., & Verkerk, G. A. (2005). Pregnancy loss in dairy cattle in the Waikato region of New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, 53(5), 279-287.
- Moore, D.A., Overton, M.W.; Chebel, R. C.; Truscott, M.L., & BonDurant, R.B. (2005). Evaluation of factors that affect embryonic loss in dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 226(7), 1112-1118.
- More, S. J., Clegg, T. A., & O'Grady, L. (2012). Insights into udder health and intramammary antibiotic usage on Irish dairy farms during 2003-2010. *Irish veterinary journal*, 65(1), 1.
- Morek- Kopeć, M., Zarnecki, A., & Jagusiak, W. (2009). Association between somatic cell score of milk and fertility traits in Polish Holstein Friesian cows. *Animal Science Papers and Reports*, 27(1), 15-22.
- Morris, M.J., Kaneko, K., Uppal, S.K., Walker, S.L., Jones, D.N., Routly, J.E., Smith R.F., Dobson, H. (2013). Effects of high somatic cell counts in milk on reproductive hormones and oestrus behaviour in dairy cows with special reference to those with concurrent lameness. *Animal reproduction science*, 141(1), 20-25.
- Morris, M. J., Walker, S. L., Jones, D. N., Routly, J. E., Smith, R. F., & Dobson, H. (2009). Influence of somatic cell count, body condition and lameness on follicular growth and ovulation in dairy cows. *Theriogenology*, 71(5), 801-806.
- Moussavi, H.A, Mesgaran, M.D, & Gilbert, R.O. (2012). Effect of mastitis during the first lactation on production and reproduction performance of Holstein cows. *Trop. Animal Health Prod.*, 44, 1567-1573.
- National Mastitis Council. (2009). *Nutrition's role in mammary gland health*. The NMC Newsletter: Udder Topic. 32, 3-7.
- Nava-Trujillo, H., Soto-Belloso, E., & Hoet, A.E. (2010). Effects of clinical mastitis from calving to first service on reproductive performance in dual-purpose cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 121(1), 12-16.
- Olechnowicz, J., & Jaskowski, M.J. (2013). A Connection Between Mastitis During Early Lactation and Reproductive Performance of Dairy Cows – A Review. *Annals of Animal Science*, 13(3), 435-448.
- O'Rourke, D. (2009). Nutrition and udder health in dairy cows: a review. *Irish Veterinary Journal*, 62(4), 15-20. DOI: 10.1186/2046-0481-62-S4-S15
- Pedroso, R. (2011, abril). *Interacción nutrición reproducción del ganado bovino en pastoreo. Mesa redonda*. VII. Congreso Internacional de Medicina Veterinaria. Palacio de las Convenciones. La Habana, Cuba.
- Perrin I., Bostelmann, R.W., & Sheldon, I.M. (2007). Reduced conception rates associated bovine mastitis during a "window of opportunity". *Veterinary Record*, 161(2) 61- 62.
- Petrovski, R.K. (2011) *Treatment before calving of heifers for mastitis improves their reproductive performance but not their milk production*. (Thesis PhD). Massey University Palmerston North, New Zealand.
- Pinedo, P., Risco, C., & Melendez, P. (2011). A retrospective study on the association between different lengths of the dry period and subclinical mastitis, milk yield, reproductive performance, and culling in

- Chilean dairy cows. *Journal of dairy science*, 94(1), 106-115.
- Price, J.C., Bromfield, J.J., & Sheldon, I.M. (2013). Pathogen-associated molecular patterns initiate inflammation and perturb the endocrine function of bovine granulosa cells from ovarian dominant follicles via TLR2 and TLR4 pathways. *Endocrinology*, 154(9), 3377-3386.
- Rahman, M.M., Mazzilli, M., Pennarossa, G., Brevini, T. A., Zeconi, A., & Gandolfi, F. (2012). Chronic mastitis is associated with altered ovarian follicle development in dairy cattle. *Journal of dairy science*, 95(4), 1885-1893.
- Rahman, M.M. (2010). *Morphometric correlation and molecular studies of chronic mastitis and fertility in dairy cattle*. (Thesis PhD). Faculty of Veterinary Medicine, Università Degli Studi Di Milano. Italia .
- Ribeiro, E. S., Gomes, G., Greco, L., Cerri, R. L., Vieira-Nieto, A., Monteiro, P. L. Jr., Lima, F. S., Bisinoto, R. S., Thatcher, W., & Santos, J. E. (2016). Carryover effect of postpartum inflammatory disease on developmental biology and fertility in lactating dairy cows. *Journal of dairy science*, 99(3), 2201-2220.
- Risco, C.A. (2009). Manejo estratégico durante el período de transición para optimizar la producción y el comportamiento reproductivo del ganado lechero. *Rev. Med. Vet. Zoot.* 56, 228-249.
- Roth, Z. (2015). Physiology and endocrinology symposium: Cellular and molecular mechanisms of heat stress related to bovine ovarian function. *Journal of animal science*, 93(5), 2034-2044. doi:10.2527/jas2014-8625
- Roth, Z., Dvir, A., Kalo, P., Lavon, Y., Krifucks, Q., Wolfenson, D., & Leitner, G. (2013). Naturally occurring mastitis disrupts development competence of bovine oocytes. *Journal of dairy science*, 96(10), 6499-6505.
- Ruiz, A.N., Peña, J., González, D., & Ponce, P. (2013, noviembre). *Sistema de ordeño y situación de la mastitis bovina en Cuba*. ALPA.XXIII. Palacio de las Convenciones, La Habana
- Santos, J. E. P., & Ribeiro, E.S. (2014). Impact of animal health on reproduction of dairy cows. *Anim Reprod.*, 11(3), 254-269.
- Santschi, D.E. & Lefebvre, D.M. (2014). Review: Practical concepts on short dry period management. *Can. J. Anim. Sci.*, 94(3), 38- 390.
- Scenna FN, Edwards, J.L, Schrick F.N (2008). Detrimental effects of prostaglandin F₂ α on embryo development in bovine are inhibited by a receptor antagonist. *Reproduction Fertility and Development*. 20(1), 153-154.
- Scenna, F.N. (2006). *Inhibition of Direct Prostaglandin F₂ α Effects on Pre-attachment Embryos Improves Reproductive Efficiency in Cattle*. Thesis ,PHD, University of Tennessee. EEUU.
- Schrack, F.N., Hockett, M.E., Saxton, A.M, Lewis, M.J., Dowlen, H.H., & Oliver, S.P. (2001). Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. *J. Dairy Sci.* 84(6), 1407-1412.
- Singh, J., Domínguez, M., Jaiswal, R., & Adams, G. P. (2004). A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *Theriogenology*, 62(1), 227-243.
- Sominsky, L., Sobinoff, A.P., Matthew, S., Pye, V., Mcaughlin, E.A., & Hodgson, M.D. (2013). Immune regulation of ovarian development programming by neonatal immune challenge. *Frontiers in neuroscience*, 7, 100-1005. doi: 10.3389/fnins.2013.00100
- Soto, P., Natzke, R.P., & Hansen, P. J. (2003). Actions of Tumor Necrosis Factor α on Oocyte Maturation and Embryonic Development in Cattle. *American Journal of Reproductive Immunology*, 50(5), 380-388.
- Sordillo, L.M. (2009). Current concepts on immunity and mastitis. *WCDS Advances in dairy technology*, 21, 11-119.
- Spears, J. W., & Weiss, W. P. (2008). Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. *The Veterinary Journal*, 176(1), 70-76.
- Stakheeva, M , & Plemyashov. K . (2007, enero). The Analysis of the effect of mastitis breeding. *Mastitis symposium, Proceedings*

- from a symposium. St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine. Russia.
- Sugino, N. (2006). Roles of reactive oxygen species in the corpus luteum. *Animal science journal*, 77(6), 556-565.
- Thatcher, W.W, Bilby, T.R, Bartolome, J.A., Silvestre, F., Staples, C.R., & Santos, E.P. (2006). Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. *Theriogenology* 65(1), 30-44.
- Torres. R.G., Paez, R., Azum, J. L; Roller-Gutierrez, F., González, N., Albiol, J., Pedrosa Sosa, R.(2016). Uso del sulfato de cobre vía parenteral en vacas hipocuprémicas con mastitis y su efecto en la fertilidad. *Revista La Técnica*, 16, 56-63.
- Vacek, M., Stádnik, Stípková, M.(2007). Relationships between the incidence of health disorders and the reproduction traits of Holstein cows in the Czech Republic. *Czech Journal of Animal Science*, 52(8), 227.
- Van Ryn, M. (2009). *Relationship of Copper, Zinc and Selenium Status with Udder Health and Mastitis Incidence in the Cal Poly Holstein Herd. Work Carry Out In: Dairy Science Department College of Agriculture, Food and Environmental Sciences California Polytechnic State University San Luis Obispo. EEUU.*
- Walusimbi, S.S., & Pate, J.L. (2013). Role of immune cell in corpus luteum. Proceeding: Physiology and Endocrinology Symposium. *Journal of animal science*, 91(4), 1650-1659.
- Williams, E.J., Sibley, K., Miller, A.N., Lane, E.A., Fishwick, J., Nash, D.M., Herath, S., England, G.C., ,Dobson, H., & Sheldon, I.M. (2008). The effect of Escherichia coli lipopolysaccharide and tumour necrosis factor alpha on ovarian function.. *American journal of reproductive immunology*, 60(5), 462-473.
- Wilson, D.J., Grohn, Y. T., Bennett, G.J., González, R.N., Schukken, Y H., & Spatz, J. (2008). Milk production change following clinical mastitis and reproductive performance compared among J5 vaccinated and control dairy cattle. *Journal of dairy science*, 91(10), 3869-3879. DOI: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2008-1405>
- Wolfenson, D., Leitner, G., & Lavon, Y. (2015). The disruptive effects of mastitis on reproduction and fertility in dairy cows. *Italian Journal of Animal Science*, 14(4), 4125.
- Yang, F. L., Li, X.S, Yang, B.Z, Zhang, Y, Zhang, X.F, Qin, G.S, & Liang, X.W. (2012). Clinical mastitis from calving to next conception negatively affected reproductive performance of dairy cows in Nanning, China. *African Journal of Biotechnology* 11(10), 2574-2580.
- Yang, M.Y., & Fortune, J.E. (2007). Vascular endothelial growth factor stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles in vitro. *Molecular reproduction and development*, 74(9), 1095-1104.
- Zebeli, Q., Mansmann, S., Sivaraman, S. M., Dunn, S. M., & Ametaj, B. N. (2013). Oral challenge with increasing doses of LPS modulated the patterns of plasma metabolites and mineral in periparturient dairy cows. *Innate immunity*, 19(3), 298-314.