

Informe final publicable de proyecto

Metabolismo energético y nitrooxidativo de ácidos grasos en sistemas lecheros pastoriles: Impacto sobre la salud animal y calidad de productos lácteos

Código de proyecto ANII: FSA_1_2018_1_152220

Fecha de cierre de proyecto: **04/01/2024**

CARRIQUIRY, Mariana (Responsable Técnico - Científico)
CASSINA GÓMEZ, Adriana María (Co-Responsable Técnico-Científico)
JORGE SMEDING, Ernesto Ezequiel (Investigador)
TROSTCHANSKY VASCONCELLOS, Andrés Ezequiel (Investigador)
ESCOBAR GIANNI, Daniela (Investigador)
GARCÍA-ROCHE, Mercedes (Investigador)
HIRIGOYEN, Dario (Investigador)
MENDOZA AGUIAR, ALEJANDRO (Investigador)
QUIJANO HERRERA, Celia Lía (Investigador)
ASTESSIANO DICKSON, Ana Laura (Investigador)
CASAL SPERA, Alberto (Investigador)
BARBEITO OSINAGA, Joaquín (Becario)
CAÑIBE SILVA, Guillermo Federico (Becario)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE MEDICINA \\ INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA
\\ REDES NACIONALES. RED TECNOLÓGICA SECTORIAL EN LECHERÍA \\
LABORATORIO TECNOLÓGICO DEL URUGUAY. FUNDACIÓN LATITUD \\
FACULTAD DE AGRONOMÍA. FUNDACIÓN DR. EDUARDO ACEVEDO

Resumen del proyecto

Este proyecto buscó contribuir a identificar estrategias de intensificación productiva para los sistemas de lecheros en Uruguay, de manera que sean sostenibles, en términos de productividad, eficiencia y medio ambiente, y generen un producto diferenciado en calidad. Es así que se trabajó en dos plataformas experimentales con metodología de "farmlets" - de Facultad de Agronomía (EEMAC) e INIA-La Estanzuela, evaluando el impacto de la nutrición, el genotipo lechero, y el ambiente productivo en las adaptaciones en el metabolismo energético hepático a lo largo de la lactancia y la calidad nutricional de los productos lácteos, haciendo foco en ambos casos en el metabolismo lipídico. Confirmamos, que el deterioro de la función mitocondrial hepática de las vacas lecheras durante la lactancia temprana se agrava más en estrategias de alimentación con mayores proporciones en la dieta de pasto cosechado directamente (inclusión del pastoreo vs. dietas totalmente mezcladas) asociado a un menor estatus metabólico general. Por otra parte, en comparación con las vacas Holando norteamericanas, las neozelandesas adaptaron mejor, durante la lactancia, su metabolismo hepático a estrategias de alimentación con mayores proporciones de pasto cosechado directamente en la dieta y las condiciones del ambiente productivo -infraestructura durante la suplementación de vacas a pastoreo- tuvieron un impacto mayor cuando las condiciones ambientales -temperatura y humedad- fueron menos favorables (olas de calor en verano), observándose un metabolismo energético hepático más comprometido en vacas a pastoreo suplementadas a cielo abierto que en compost barn. Finalmente, mostramos que la leche contiene concentraciones micromolares de ácido linoleico conjugado nitrado (NO₂-cLA) endógeno y que varía con el genotipo lechero y el momento de la lactancia; siendo los NO₂-cLA capaz de modular a nivel fisiológico las respuestas metabólicas, lo posiciona como un nutriente de alto interés fisiológico y nutracéutico, de importancia para la salud humana.

Ciencias Agrícolas / Producción Animal y Lechería / Ciencia Animal y Lechería (la biotecnología animal va en "Biotecnología Agropecuaria") / Producción lechera

Palabras clave: hígado graso / estrés oxidativo / nitrolípidos /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

Uruguay es un país netamente exportador, se exporta más del 70% de la leche producida y el volumen de las exportaciones posiciona a Uruguay como el séptimo país exportador mundial de leche (INALE, 2017), representando el mayor ingreso de exportaciones por hectárea en el sector agropecuario. Este perfil de nuestro país, exportador y tomador de precios frente a un mercado internacional competitivo y fluctuante, determina que tanto el control de los costos de producción como la calidad del producto sean clave para la competitividad de los sistemas de producción y del sector en su conjunto. Los sistemas productivos nacionales se caracterizan por ser explotaciones a cielo abierto de ganado Holstein de origen americano (aprox. 80%), con alimentación basada en pastoreo directo suplementado con forraje conservado y concentrados (sistemas mixtos) (INALE, 2017). El re-diseño de sistemas de producción de leche sostenidamente competitivos requiere de una investigación integrada donde estrategias de alimentación, ambiente productivo y genotipos lecheros, componentes centrales en la definición de los sistemas lecheros (García, 2002), interrelacionen con la performance animal, preservando el medio ambiente, generando un producto de calidad y siendo económicamente competitivos y rentable.

Si bien los sistemas pastoriles tienen ventajas en términos de la cantidad y tipo de sólidos producidos, salud y bienestar animal, y disminución de los costos de producción (Dillon, 2006), los sistemas con mayor inclusión de pastura directamente cosechada directamente por el animal tienen más dificultades en asegurar un flujo estable de nutrientes a los animales a lo largo del tiempo, debido a las importantes variaciones temporales tanto en cantidad como calidad del forraje, respecto a sistemas estabulados. El consumo de materia seca (MS) en sistemas pastoriles es usualmente más bajo que en sistemas de confinamiento y podría ser insuficiente para sostener la alta producción de leche que podría lograrse con el potencial genético (Kolver y Muller 1998; Chilibróste et al. 2012). En investigaciones nacionales, el análisis de las curvas de lactancia (Chilibróste et al. 2011) sugiere que los animales no logran expresar su potencial productivo, seguramente en respuesta al desacople entre requerimientos-oferta de nutrientes y ambiente productivo. Además, en sistemas donde el pastoreo directo tiene un rol preponderante existen costos adicionales de energía para el animal, asociados a la caminata y la cosecha del forraje, que no existen en sistemas estabulados y que reducen la disponibilidad de nutrientes que pueden destinarse a producir leche (Fajardo et al., 2015; Astessiano et al., 2017). Es así que, la producción lechera en nuestro país está basada en sistemas mixtos (Chilibróste, 2015) ya que son una manera de dar respuesta al desbalance estructural entre la oferta y demanda de nutrientes (pasturas vs. requerimientos del rodeo) y mantener las ventajas de la producción pastoril (Dillon, 2006).

El establecimiento exitoso de la lactancia - en términos productivos y reproductivos - implica que la vaca lechera transite adecuadamente el pasaje de gestante no lactante a lactante no gestante. Esta transición constituye el momento más

desafiante en términos metabólicos para la vaca lechera ya que los excesivos requerimientos energéticos de la lactogénesis no pueden alcanzarse con el consumo de materia seca y se desarrolla el balance energético negativo (BEN) (Drackley et al., 1999). Para responder esta demanda, el metabolismo de la vaca lechera se adapta a los requerimientos de la lactogénesis movilizandando sus reservas corporales. Estas adaptaciones requieren un incremento y adecuado funcionamiento del metabolismo hepático, ya que el hígado es la central metabólica del animal y el principal regulador e integrador del estatus metabólico (McCarthy et al., 2010; Drackley et al., 1999). Este órgano muy activo, juega un rol crítico en el metabolismo de los glúcidos, proteínas y lípidos (Wei et al., 2008). En la lactancia temprana, el hígado por medio de la gluconeogénesis produce una gran cantidad de glucosa, que se utiliza en gran parte para la síntesis de lactosa para la producción de leche a la vez que transforma los ácidos grasos de reserva (movilización tejido adiposo) en una fuente de energía - mediante la oxidación y la cetogénesis - que puede ser utilizada por todos los tejidos de la vaca. En un contexto donde la entrada de ácidos grasos no esterificados al hígado es muy alta, aumenta la acumulación de triglicéridos y la vaca lechera puede desarrollar esteatosis hepática que a su vez puede volverse patogénico cuando sufre disfunción mitocondrial (Kendrick et al., 2011, Cimen et al., 2010), aumento en los niveles de citoquinas y adipoquinas y/o estrés del retículo endoplásmico (Nassir y Ibdah, 2014). Este estado alterado de la función hepática amenaza tanto a la salud del animal como su bienestar y en consecuencia el rendimiento productivo (Ingvarsten y Moyes, 2013).

El rol de la mitocondria es central en la producción de energía, la síntesis y catabolismo de metabolitos, regulación de la concentración de ion calcio citosólica y algunas formas de apoptosis; también tienen un rol protagónico en la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS), ya que son responsables del 90% de los ROS producidos a nivel celular (Brand y Nicholls, 2011; Nassir e Ibdah, 2014). Una alta tasa de oxidación de ácidos grasos puede generar un flujo excesivo de electrones tanto en la beta-oxidación (Cardoso et al., 2013; Tahara et al., 2007) como hacia la cadena respiratoria y esto podría resultar en una producción mayor de ROS. Dicha producción excesiva de ROS podría exceder la capacidad antioxidante de la célula y llevar a la oxidación de componentes de la célula como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Nassir e Ibdah, 2014), disfunción en la cadena respiratoria mitocondrial (Wei et al., 2008, Nassir e Ibdah, 2014) y finalmente ocasionando apoptosis. Esta situación fisiológica, en la medida que la dieta cuenta con una base pastoril, interacciona con un sistema de producción a cielo abierto, donde se suman los efectos del ambiente (i.e. temperaturas y humedad) y de manejo (i.e. pastoreo, caminatas), afectando el metabolismo y los requerimientos de energía y, por lo tanto, la expresión del potencial productivo, los riesgos de salud y la eficiencia de producción, aspectos centrales en la competitividad de los sistemas lecheros.

El equipo de trabajo ha desarrollado numerosos trabajos que han demostrado que el manejo de pasturas con buena disponibilidad y altura de forraje al momento del ingreso al pastoreo con asignaciones no limitantes permitirán buena eficiencia de cosecha y promoverán altas tasas de consumo de los animales pero cuando la cantidad de forraje en el sistema es limitante, se debe priorizar sesiones cortas de pastoreo en la tarde determinarán un pastoreo más eficiente. A su vez, para la inclusión de una segunda sesión corta de pastoreo se debería considerar la distancia a la pastura ya que los requerimientos de energía para mantenimiento de los animales aumentan (caminata y actividad de cosecha) lo que podría determinar respuestas productivas y reproductivas menores a las esperadas (Aguerre et al., 2017). Se ha demostrado que es posible combinar dietas totalmente mezcladas (DTM) con pasturas y tener resultados productivos similares a los de animales alimentados únicamente con DTM. Los efectos sobre el estatus endócrino/metabólico, la producción y la reproducción cuando se incluyen pasturas de alta calidad en dietas de animales consumiendo DTM es resultado de efectos sobre el consumo y la demanda de energía asociada a una mayor caminata y actividad de pastoreo y no de efectos sobre la digestión o utilización de los nutrientes por parte del animal. Así, bajar la asignación de forraje, el tiempo de acceso a la pastura o aumentar la distancia de traslado al pastoreo pueden condicionar la respuesta animal (Aguerre et al., 2017). Además, hemos reportado que, durante la lactancia temprana, la función mitocondrial de vacas lecheras altamente productoras se vio comprometida y que la respuesta durante la lactancia estaba fuertemente modulada por la estrategia de alimentación (DTM vs. pastura + suplemento) (García-Roche et al., 2021). Una menor función de la mitocondria podría significar menos eficiencia energética disminuyendo la eficiencia productiva a nivel individual y del sistema. Asimismo, encontramos que la acetilación (modificación post-traduccionales de proteínas) se asoció a la caída en la función mitocondrial durante la lactancia temprana; estando la acetilación correlacionada con altos niveles de cuerpos cetónicos en sangre y triglicéridos en tejido hepático. A su vez, vacas lecheras alimentadas con DTM ad libitum en lactación temprana mostraron un menor estrés oxidativo a nivel sanguíneo y lipoperoxidación hepática y que la dieta influía sobre los niveles de la Sirtuina 3 una desacetilasa dependiente de NAD presente en la mitocondria.

Por otra parte, el genotipo Holando predominante (aprox. 80%) en nuestro país es de origen americano (EEUU y Canadá;

Holando americano; NAH) seleccionada en sistemas estabulados basados en el uso de DTM y caracterizada por tener un alto PV y capacidad de producir más litros de leche por la mayor partición de nutrientes consumidos hacia la glándula mamaria (Kolver et al., 2002; Fulkerson et al., 2008). En contraste, la literatura (Lucy et al., 2009; Kolver et al., 2000, 2002; Fulkerson et al., 2008) sugiere que las vacas Holstein de origen neozelandés (NZH) se adaptan mejor en base pastoril que las vacas NAH ya que si bien no tuvieron diferencias en rendimiento de sólidos, contenido proteico de la leche y persistencia de la lactancia, las de genotipo NAH no lograron mantener un índice de BCS y PV aceptables, mientras que las NZH sí (Lucy et al., 2009; Kolver et al., 2002; Fulkerson et al., 2008). A su vez, Lucy et al. (2009) explican que estas diferencias se deben al desacople del eje somatotrópico que conduce la partición de nutrientes, demostrando que las vacas HEU tienen un alto desacople del eje mientras que las HNZ mantuvieron un eje somatotrópico acoplado. En Uruguay son escasos los trabajos que incluyan la evaluación del desempeño de distintos genotipos bovinos en distintas condiciones ambientales y trabajos del equipo han evaluado vacas NAH vs. cruza (NAH x NZH) en sistemas pastoriles (Pereira et al., 2010a; b) en términos de la producción y reproducción.

La combinación de genotipo animal, estrategia alimenticia y ambiente productivo puede afectar también la calidad de la leche, en particular, en el perfil de ácidos grasos. En los últimos años se ha caracterizado el perfil de ácidos grasos de leche en distintas estrategias alimenticias o situaciones productivas (Artegoitia et al., 2012; Barca et al. 2017; Mendoza et al., 2016), demostrando en acuerdo con la literatura internacional (Dhiman et al., 1999) que el aumento en el consumo de pastura fresca resulta en un aumento de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) omega-3 y de CLA en la leche. Sin embargo, no se ha explorado a nivel nacional ni internacional el contenido de ácidos grasos nitrados (NO₂-FA) en la leche. Los NO₂-FA constituyen nuevas moléculas recientemente descubiertas de potente acción anti-inflamatoria, formados endógenamente en diversos tipos celulares animales y vegetales. Entre los ácidos grasos PUFA que presentan mayor relevancia en su capacidad protectora cuando sufren procesos de nitración se encuentra el CLA. Una de las principales fuentes de consumo por parte de los humanos de CLA son la leche y sus derivados ya que el proceso de biohidrogenación de los PUFA se da en el rumen de la vaca. En el rumen del animal en presencia de nitrito más el pH ácido del ambiente se puede dar la formación de CLA nitrado (NO₂-CLA), el cual podría en caso de aumentar su cantidad en los productos lácteos ser una fuente natural de NO₂-FA. Por tanto, cambios en la composición de la leche pueden afectar la cantidad de NO₂-FA que se puedan formar, agregándole un nuevo valor al producto. En proyectos previos se determinó la presencia y propiedades anti-inflamatorias de los NO₂-FA en modelos animales y humanos y los resultados obtenidos en conjunto sugieren que los AGN podrían actuar como moduladores endógenos de la respuesta inflamatoria (Trostchansky et al 2007, Bonacci et al. 2011; Ferreira et al. 2009; Gonzalez-Perilli L. et al., 2013).

El desafío radicó en la comprensión de los procesos biológicos que interaccionan en la respuesta animal al modificar alternativas de intensificación - combinando nutrición, ambiente y genotipo animal - que permitan maximizar la productividad y eficiencia de los sistemas de lecheros, explotando el potencial genético de los animales, sin comprometer la salud, reproducción y longevidad de las vacas lecheras y valorando el producto de comercialización parecería ser relevante para la economía nacional. Este proyecto se propuso hacerlo de forma completa, integral, e interdisciplinaria integrando investigadores de diferentes especializaciones e instituciones, generando información novedosa en nuestro país y a nivel internacional

Metodología/Diseño del estudio

Este proyecto planteó el trabajo en dos plataformas de experimentación llevadas adelante en la Estación Experimental Mario A. Cassinoni (EEMAC, Paysandú) de la Facultad de Agronomía y en INIA- La Estanzuela (Colonia). Estas plataformas trabajaron en condiciones de campo y a escala de sistema completo con metodología de "farmlets" durante 2 o 3 años consecutivos. El diseño del trabajo de "farmlets" se considera un modelo de investigación superior al modelo que trabaja por componentes individuales en experimentos de corto plazo para abordar la problemática de la intensificación productiva sustentable. Estas dos plataformas permiten evaluar las respuestas a estos sistemas sobre variables específicas del componente animal, del componente pastura y de sus interacciones.

1) Plataforma INIA-LE. Esta plataforma integró el proyecto de INIA-Lechería 10-MIL y evaluó 4 sistemas diseñados para lograr una alta cosecha de forraje producido en el propio predio (>10 ton MS/ha) y alcanzar una producción de 1000 kg/ha de sólidos lácteos, que surgían de combinar dos estrategias de alimentación: estrategia donde se maximizó la inclusión de pastura en la dieta cosechada directamente (MáxP) o estrategia donde la cantidad de pastura cosechada en la dieta fue restringida (30% del consumo total; FixP), y 2 genotipos Holando: vacas de origen norteamericano (NAH) o neozelandés (NZH) (n=30 vacas por sistema). Las vacas NAH tenían más de 75% de ascendencia de genética EEUU, con un peso promedio de 580 y un potencial de producción estimado en 7500 kg/lactancia a 305 días y las NZH más 75% de ascendencia de genética de Nueva Zelanda, con un peso promedio de 510 y un potencial de producción estimado en 5500 kg/lactancia a 305 días. En MáxP, la cantidad de pastura cosechada directamente por cada animal, a lo largo de todo el

año, fue la máxima posible en función del crecimiento de pastura en la plataforma de pastoreo mientras que en FixP la cantidad de pastura cosechada directamente por cada animal, dentro de cada estación del año, fue fija e independiente de la tasa de crecimiento de pastura en la plataforma de pastoreo. Esta última estrategia simuló la situación de productores que por diversas restricciones no pueden aumentar la cosecha de forraje por encima de un determinado nivel a largo del año.

2) Plataforma EEMAC. Esta plataforma integró el proyecto de la Red Tecnológica Sectorial en Lechería-Latitud y evaluó 3 sistemas (20 vacas por sistema) diseñados en un arreglo factorial incompleto de dos estrategias de alimentación diferente: alimentación con 100% dieta totalmente mezclada (DTM) en confinamiento en un compost barn (PAS-CB) o alimentación basada en la combinación de pastoreo intensivo y dieta parcialmente mezclada y dos niveles de control del ambiente: ambiente controlado, establo techado con sistema de cama caliente-compost (PAS-CB) y ambiente "a cielo abierto", en el cual los animales enfrenan condiciones climáticas extremos (exceso/déficit hídricos, estrés calórico, etc. (PAS-OP).

En ambas plataformas, previo al parto, las vacas preñadas fueron manejadas en forma conjunta de manera de cubrir los requerimientos de mantenimiento y gestación. Durante la lactancia las vacas fueron ordeñadas dos veces por días y la producción de leche se registró diariamente. Se tomaron muestras de leche semanales (durante periodos de medición) o quincenales a lo largo de la lactancia para la determinación de composición de leche (lactosa, grasa, proteína y urea) por el método de infra-rojo medio. A su vez, en lactancia temprana (+35 días) y media (+150 días) se colectaron muestras de leche que se dividieron en frascos de 10 mL y se congelaron a -20°C para la determinación de los NO₂-CLA. El peso vivo (PV) y la condición corporal (BCS, escala 1-5; Edmonson et al. 1989) de las vacas se registró quincenalmente.

Además, en la plataforma de INIA-LE se colectaron en cuatro momentos de un ciclo de producción de vacas paridas en otoño (correspondiente también con diferentes estaciones del año): período seco (-45 días posparto), lactancia temprana (+21 días), media (+120 días) y tardía (+240 días) muestras de sangre de la vena coccígea y de hígado mediante biopsias (Carrquiry et al., 2009). Asimismo, se colectaron durante tres años consecutivos muestras de sangre e hígado en lactancia. En la plataforma de la EEMAC, las muestras de sangre e hígado se colectaron durante la lactancia temprana (+35 días) y media (+150 días) de vacas paridas en dos épocas del año (otoño y primavera), correspondiendo también los 4 muestreos a las diferentes estaciones del año. Las muestras de hígado se congelaron en N líquido y/o criopreservaron (García-Roche et al., 2018) para su conservación a -80°C y posterior análisis.

En las muestras de sangre, se determinaron las concentraciones de metabolitos (glucosa, NEFA, BHB, urea, colesterol, proteínas totales, albúmina) y funcionalidad hepática (AST y GGT) mediante técnicas de espectrofotocolorimetría utilizando kits comerciales (Biosystems S.A) como se ha descrito previamente (Astessiano et al., 2015), de 3-metilhistidina (3MH) después de la derivatización con fluorescamina según Houweling et al. (2012) utilizando espectrometría de masas en tándem con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-MS/MS) y de hormonas (insulina y glucagón) mediante radioinmunoanálisis o ensayos inmunoradiométricos usando kits previamente utilizados en rumiantes (Aguerre et al., 2015).

A su vez, en las muestras de sangre de la plataforma de INIA-LE se evaluaron biomarcadores de oxidación de lípidos y proteínas determinando las concentraciones plasmáticas de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) según Wernicki et al. (2006) y carbonilos de proteínas de acuerdo a Ceci et al., (2015), respectivamente. El sistema antioxidante se evaluó mediante la actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GPx) en plasma, así como la concentración plasmática de alfa-tocoferol (vitamina E). La actividad de SOD y GPx se midió espectrofotométricamente mediante ensayos cinéticos utilizando kits comerciales (Randox Laboratories Ltda). La concentración plasmática de α -tocoferol se determinó mediante un método de HPLC de fase inversa (Schweigert et al., 2003).

En las muestras de hígado se caracterizó y cuantificó la movilización de reservas y la formación de hígado graso determinando en homogeneizados la concentración de triglicéridos utilizando un kit comercial (Biosystems S.A), la concentración de proteína (Bradford et al., 1976), y la concentración de glucosa libre y glucógeno (previa digestión; Bancroft y Fry, 1933) utilizando el kit de detección de glucosa comercial (Biosystems S.A). El análisis de la función mitocondrial- respiración en hígado se realizó por medio de respirometría de alta-resolución (Oroboros 2k o Oxytherm de Hansatech Instruments Ltd) de acuerdo a García-Roche et al. (2018). Las tasas de consumo de oxígeno se evaluaron utilizando glutamato / malato (G/M), succinato (succ), palmitoil-CoA / carnitina (p-CoA /car) y palmitoil-carnitina (p-car) como sustratos.

En las muestras hepáticas se determinó también la abundancia de mRNA de genes relacionados con la función

mitocondrial, el metabolismo de la glucosa y/o de los ácidos grasos así como de factores de transcripción o de regulación relacionados con estas vías metabólicas por medio de PCR en real time de acuerdo a la metodología previamente descrita (Carriquiry et al., 2009; Astessiano et al., 2017) usando primers específicamente diseñados y validados. Los niveles de proteína en hígado se evaluaron mediante la técnica de Western blot utilizando anticuerpos específicos (Koo et al., 2004). También se evaluarán por western blot modificaciones post-traduccionales como los niveles de acetilación de lisinas proteicas y de fosforilación de la quinasa activada por AMP (García-Roche et al., 2021). La actividad enzimática (citrato sintasa, succinato deshidrogenasa y/o la carnitina palmitoil-transferasa se midió espectrofotométricamente mediante ensayos cinéticos (Bieber et al., 1972; Casal et al., 2019).

Las muestras de leche colectadas con este fin fueron procesadas para extraer, analizar y cuantificar ácidos grasos nitrados se aplicaron técnicas analíticas basadas en diferentes y sucesivos métodos de extracción lipídica y espectrometría de masas y se utilizaron 15NO₂-cLA y NO₂-SA como estándares internos. El análisis cuantitativo se realizó en un espectrómetro de masa QTRAP 4500 y los softwares Analyst 1.6.1, MultiQuant, LipidViewer y GraphPad 8.0. Para confirmar que el NO₂-cLA detectado en la leche correspondía a un ácido graso nitrado electrofílico, se realizó un ensayo de reactividad con el nucleófilo γ -mercaptoetanol (BME).

Para el análisis estadístico de estos datos, los animales fueron considerados como la unidad experimental para todas las variables medidas en ellos, del mismo modo que en el pasado donde los animales son manejados en grupo de forma de simular sistemas lecheros de forma realística (Fulkerson et al., 2008). Los datos fueron analizados con un modelo lineal mixto (para variables continuas) o lineal generalizado (para variables discretas) para analizar cada base de datos, que incluyó la estrategia de alimentación, el genotipo animal o ambiente productivo (según corresponda), el momento de lactancia y la interacción entre factores como efectos fijos, el animal individual como efecto aleatorio y la fecha de parto como covariable. Las medias se compararon con el test de Tukey. Las relaciones entre las variables se estudiaron mediante análisis de correlaciones.

Por último, se realizó el metaboloma hepático en un subconjunto de vacas deFixP de origen genético NAH (n = 7) y vacas MaxP de origen genético NAH (n = 5) a 180 DIM (plataforma INIA-LE) o de vacas de parición primavera en PAS-CB (n= 6) o PAS-OP (n= 6) en lactancia media (plataforma EEMAC). El análisis metabolómico se realizó utilizando cromatografía de gases y espectrometría de masas de tiempo de vuelo (GCToF/MS) como anteriormente descrito por Fiehn et al. (2008) en el Core Facility West Metabolomics Center (UC Davis Genome Center, Davis, CA, EE. UU.). El análisis de los datos metabolómicos se realizó con MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>, consultado el 4 de enero de 2022). Los datos se normalizaron mediante transformaciones logarítmicas y la calidad de los datos se evaluó comparando muestras agrupadas con muestras individuales en un análisis multivariado. Para los análisis estadísticos, se calcularon los valores de p (tasa de descubrimiento falso (FDR), nivel $\alpha = 0,10$) y los cambios en veces para las comparaciones entre grupos para cada característica molecular. Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) en el conjunto de datos metabolómicos para analizar la varianza general entre las vacas. Se realizó el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) y se obtuvieron puntuaciones de importancia de las variables en la proyección (VIP). Se consideró que los metabolitos diferían cuando VIP > 1,0 y el análisis de enriquecimiento de la vía se realizó con la base de datos de la vía de la Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto. El enriquecimiento significativo de la vía metabólica se estableció en FDR < 0,10. La evaluación estadística de las diferencias de grupo mediante la prueba t se realizó y se visualizó con gráficos de volcán que fijaron el FDR en < 0,10.

Resultados, análisis y discusión

Nuestro trabajo ha demostrado que existe un efecto de la interacción genotipo \times ambiente no solo en la producción sino también en la adaptación metabólica al comparar vacas de genotipos NAH vs. NZH bajo diferentes estrategias de alimentación (MáxP vs. FixP). En comparación con las vacas NAH, las vacas NZH desarrollaron mejores respuestas metabólicas para hacer frente a condiciones de pastoreo sugeridas por su mejor estado energético (glucosa, insulina, colesterol) y menor riesgo de desarrollar trastornos metabólicos como lo sugiere su índice de desbalance fisiológico más bajo, especialmente cuando son comparadas bajo máxima inclusión de pastura en la dieta (MáxP) (Jorge Smelding et al., 2022).

Durante lactancia temprana, en hígado, los niveles de glucógeno – reservas de glucosa – disminuyeron mientras que los niveles de triglicéridos aumentaron, a la vez que la función mitocondrial – potencial de síntesis de ATP – y la actividad de la carnitina palmitoil-transferasa (CPT) - enzima que determina la tasa de oxidación de ácidos grasos – para las vacas de ambos orígenes genéticos (NAH y NZH). Confirmando reportes anteriores de nuestro equipo de investigación (García-Roche et al., 2019; 2021), observamos que esto se vio agravado en vacas sometidas a una dieta con máxima inclusión de pasturas (MáxP) (García-Roche et al., 2023a). En acuerdo con estos resultados, al estudiar la acetilación -una modificación post-traduccionales relevante en las vías metabólicas relacionadas con la síntesis de ATP y que proviene de la movilización

exacerbada de reservas lipídicas y por lo general inhibe la actividad de enzimas mitocondriales - vimos que estaba especialmente aumentada en vacas NAH sometidas a la estrategia MaxP; explicando la disminución en la función mitocondrial. Por otra parte, observamos que en lactancia media, las vacas NZH tuvieron mayor expresión génica hepática de genes asociados a la oxidación de los ácidos grasos (acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga, y acetil-CoA acetiltransferasa junto con reguladores transcripcionales: receptor activado por proliferador de peroxisomas alfa, receptor de ácido retinoico alfa y receptor X retinoico beta) en comparación con vacas NAH; resaltando la adaptación diferencial del metabolismo energético hepático en vacas de distinto origen genético (García-Roche et al., 2023). Además, las diferencias adaptativas metabólicas entre las vacas NAH y NZH en pastoreo parecerían no solo estar relacionadas con el metabolismo energético sino también con el metabolismo proteico y el metabolismo redox. La mayor inclusión del pastoreo en la dieta condujo a un mayor catabolismo muscular, pero a una mayor sensibilidad redox que conduce para reducir el daño oxidativo de las proteínas y mejorar el estado antioxidante. A pesar de que fue evaluado por un enfoque semicuantitativo, nuestros resultados sugieren que las vacas NZH tuvo una mayor recuperación metabólica después del parto en comparación con NAH, particularmente cuando se maximizó la actividad de pastoreo (MáxP) (Jorge-Smelling et al., 2022)

Comparando el metaboloma hepático de vacas NAH en los dos sistemas de alimentación durante la lactancia media-tardía, encontramos que las vacas FixP priorizaron vías metabólicas anabólicas favoreciendo por ejemplo la síntesis proteica mientras que las vacas MaxP priorizaron el ciclo de la urea -una vía metabólica costosa pero necesaria para la detoxificación del nitrógeno- vinculada con el mayor consumo de pasturas (García-Roche, 2022). En este sentido, el estudio del metabolismo hepático en lactancia media de vacas NZH y NAH en MáxP durante tres años, demostró que las vacas NZH presentaban una función mitocondrial ya que los parámetros de respiración relacionados con la síntesis de ATP se incrementaron mientras mantenían una similar producción de sólidos en leche. Asimismo, las vacas NAH tuvieron una mayor expresión hepática de genes de la neoglucogénesis (piruvato carboxilasa y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa), lo que probablemente se traduzca una menor disponibilidad de equivalentes reducidos para la fosforilación oxidativa ya que ni piruvato ni oxalacetato (sustratos de estas enzimas) son combustibles del ciclo de Krebs (García Roche et al., 2022). Además de una función mitocondrial mejorada, las vacas NZH tuvieron una mayor masa mitocondrial lo que podría ser el mecanismo que les permita incrementar su capacidad respiratoria y mejora en la eficiencia alimenticia (Talmon et al., 2020)

Por otra parte, con los datos generados en estos trabajos, utilizamos en forma exploratoria un enfoque matemático para evaluar la trayectoria metabólica de una manera integrada que también podría usarse para caracterizar la resiliencia metabólica individual a través de los patrones de respuesta y recuperación a una perturbación. Exploramos el uso del llamado vector de Perturbación (Pv) para determinar la trayectoria metabólica integrando variables metabólicas a través de un vector calculado en diferentes puntos de tiempo utilizando el conjunto de datos de vacas NAH y NZH manejadas con dos estrategias de alimentación (FixP y MáxP) muestreadas a -45, 21, 100 y 180 días en leche. Nuestros resultados demostraron que Pv se puede utilizar para evaluar la trayectoria metabólica de las vacas lecheras y derivar aún más la resiliencia individual a través del modelado dinámico de Pv (Jorge-Smelling et al.2021).

Al evaluar la estrategia de alimentación (TMR vs. sistemas mixtos: pastoreo + TMR) en relación con la infraestructura/ambiente de producción durante la suplementación (PAS-CB y PAS-OP) en dos épocas de parición (otoño vs. primavera) observamos que la producción de leche corregida por energía (ECM, kg/d) fue mayor para las vacas alimentadas en TMR en comparación los sistemas mixtos que incluyeron el pastoreo en la dieta (PAS-CB y PAS-OP) para ambas épocas de parto (otoño y primavera), si bien en términos promedio, la producción de ECM fue menor en otoño que en primavera. Esta mayor producción de leche de las vacas en TMR se asoció con consumo de energía mayor y una movilización de reservas menor como se refleja en el perfil metabólico en sangre (menores concentraciones de NEFA, triglicéridos, y urea y mayores concentraciones de insulina y relación de insulina: glucagón). Si bien los niveles de triglicéridos hepáticos fueron bajos, compatibles con un hígado graso leve, no se detectaron diferencias entre estrategias de alimentación, pero la relación glucógeno:triglicéridos en hígado fue más favorable para las vacas en TMR, aumentando de lactancia temprana a media, particularmente en vacas en esta estrategia de alimentación paridas en otoño (Cañibe et al., 2021a). Asimismo, confirmamos resultados previos de nuestro grupo de investigación (García-Roche et al., 2019; 2021; 2023) que la función mitocondrial hepática se vio disminuida durante la lactancia temprana, reflejado en una menor eficiencia de acople de la fosforilación oxidativa – oxígeno consumido destinado a la síntesis de ATP en relación al total de oxígeno consumido - y una mayor respiración no mitocondrial – oxígeno consumido no dependiente del funcionamiento de la cadena respiratoria - , tanto para el complejo I (con glutamato/malato como sustrato) como para el complejo II (con

succinato como sustrato) en lactancia temprana que media (Cañibe et al., 2020; 2021b; 2022).

Sin embargo, la estación de parto afectó las diferencias entre las estrategias de alimentación en el perfil metabólico-endocrino y en la función mitocondrial a lo largo de la lactancia. Cuando las vacas parieron en primavera, las concentraciones de glucosa en sangre disminuyeron en lactancia media mientras que las concentraciones de urea en sangre aumentaron en lactancia media solo para las vacas que pastoreaban (PAS-CB y PAS-OP) y las concentraciones de NEFA y TAG en sangre aumentaron mientras que la relación glucógeno:triglicéridos hepática tendió a disminuir solo para las vacas PAS-OP. Asimismo, si bien la función mitocondrial no fue afectada por la estrategia de alimentación el ambiente/infraestructura donde los animales recibían la suplementación (Cañibe et al., 2022), la eficiencia de acople del complejo I aumentó en lactancia media solamente cuando las vacas parieron en otoño y no en primavera. Estas respuestas diferenciales entre épocas de pariciones en el perfil metabólico y función mitocondrial a lo largo de la lactancia probablemente se encuentran asociadas al stress térmico que ocurre en la lactancia media de vacas paridas en primavera, asociado a las altas temperaturas de verano, ya que los cambios reflejan el uso de la glucosa como fuente de energía como ha sido reportado en vacas bajo estrés térmico (Wheelock et al., 2010)

Estos resultados motivaron profundizar la adaptación metabólica de las vacas en los sistemas de alimentación con inclusión de pastoreo recibiendo la suplementación en un ambiente controlado (PAS-CB) o a cielo abierto (PAS-OP) durante el verano (lactancia media, 135 y 185 DPP). La temperatura corporal fue mayor en las vacas PAS-OP en comparación con las vacas PAS-CB, siendo las diferencias más marcadas durante la suplementación cuando la exposición a las condiciones ambientales difería entre las vacas PAS-CB y PAS-OP. La mayor exposición al ambiente, determinó que diferencias en el metabolismo de los ácidos grasos ya que las vacas PAS-OP presentaron mayores NEFA y TAG asociados a una menor relación insulina:glucagón en sangre, sin modificación de la expresión de ARNm de CPT1 ni actividad de la CPT en hígado pero con una menor expresión ARNm de la acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga y una menor eficiencia de acople de la fosforilación oxidativa cuando se usaba el palmitato como sustrato. Asimismo, al comparar el metaboloma (Cañibe et al., 2023) hepático hallamos que adaptaron el metabolismo de la glucosa de forma diferencial ya que las vacas PAS-OP sostuvieron la gluconeogénesis utilizando precursores como lactato y aminoácidos (no glúcidos), resultados en acuerdo con la menor relación entre la expresión de ARNm del piruvato carboxilasa y fosfenolpiruvato carboxiquinasa en hígado. Estos resultados indican que la oxidación de los ácidos grasos mitocondrial se encuentra más comprometida y las demandas de en la síntesis endógena de glucosa incrementadas en las vacas PAS-OP que PAS-CB en acuerdo con las referencias previas del efecto de estrés calórico sobre el metabolismo energético (Wheelock et al., 2010; Skibiell, 2023).

Finalmente, al estudiar la estrategia de alimentación y el genotipo sobre hasta la ejecución de este proyecto, se desconocía si la leche bovina, fuente alimenticia relevante de ácidos grasos poliinsaturados, también contiene endógenamente ácidos grasos nitrados (NO₂-FAs). En particular, la leche bovina y sus derivados son la fuente principal del ácido graso linoleico conjugado (cLA) en la dieta para humanos, ácido graso que presenta efectos beneficiosos para la salud humana y cuya nitración podría incrementar y diversificar esas actividades biológicas. Los NO₂-FAs son productos de oxidación formados de la reacción entre los ácidos grasos (FA) insaturados y especies reactivas del nitrógeno, por ejemplo dióxido de nitrógeno (•NO₂), derivados del metabolismo celular o de procesos como la inflamación. Los NO₂-FAs, principalmente los nitroalquenos, son compuestos electrofílicos que median acciones de señalización complejas con efectos fisiológicos citoprotectores, antiinflamatorios y metabólicos. En los mamíferos, los niveles endógenos de NO₂-FAs se encuentran en sangre y tejidos a concentraciones nanomolares. Dada la presencia de una alta concentración relativa cLA en la leche vacuna, el cual es reconocido como uno de los principales ácidos grasos endógenos susceptibles de reaccionar con especies reactivas del nitrógeno, tanto in vitro como in vivo, generando NO₂-cLA. Los resultados obtenidos permitieron detectar NO₂-cLA en la leche de los bovinos analizados, en el rango de 0.013-1.6 mg/L correspondiente a 0.4-4.8 μM. El análisis comparativo de cLA y de NO₂-cLA en muestras individuales de leche permitió establecer que hasta el 2.7% del cLA lácteo se encuentra nitrado. Sin embargo, mientras que más del 97% de cLA estaba esterificado en forma de triglicéridos y fosfolípidos, la gran mayoría del NO₂-cLA se encontró como ácidos grasos libres no esterificados. Este resultado sugiere que la incorporación enzimática de NO₂-cLA a triglicéridos y fosfolípidos no es óptima y apoya la hipótesis de que el NO₂-cLA lácteo se podría estar formando en el tracto digestivo, en particular en los compartimentos ácidos y se demostró que el NO₂-cLA es un nitroalqueno (ácido graso nitrado con el grupo nitro unido a un doble enlace). En condiciones gástricas ácidas en presencia de nitrito (NO₂-), se produjo un aumento significativo en los niveles de NO₂-cLA, lo que sugiere que el consumo de leche puede significar una fuente de cLA para la formación de NO₂-cLA en el tracto digestivo durante su ingesta en humanos. Los niveles de NO₂-cLA en la leche bovina variaron significativamente con el período de lactancia y el genotipo Holando siendo mayores en lactancia temprana que media y para vacas HNZ que HNA

(Barbeito, 2023).

Conclusiones y recomendaciones

En este trabajo confirmamos, en ambas plataformas de investigación, que el deterioro de la función mitocondrial hepática de las vacas lecheras durante la lactancia temprana se agrava más en estrategias de alimentación con mayores proporciones en la dieta de pasto cosechado directamente (inclusión del pastoreo vs. TMR) asociado a un menor estatus metabólico general.

Nuestros resultados muestran que aunque las vacas de ambos genotipos Holando movilizan reservas de lípidos (medidas por los niveles de triglicéridos hepáticos) y tienen una menor función mitocondrial y actividad CPT durante la lactancia temprana, las vacas NZH adaptan mejor su metabolismo hepático a estrategias de alimentación con mayores proporciones de pasto cosechado directamente en la dieta (MaxP) como se ve a partir de niveles más bajos de acetilación mitocondrial y una regulación positiva del metabolismo oxidativo en el hígado. Si bien este trabajo mostró diferencias dramáticas en el metabolismo energético celular hepático entre los dos genotipos, más investigación se necesita para elucidar la regulación mecánica que explica este fenómeno. Mas aún, la información relacionada con el metabolismo energético celular presentada en este trabajo puede ser útil para la selección de genotipo Holando que mejor se adapta al sistema de producción con alta inclusión de pasturas cosechadas directamente (pastoreo) en la dieta.

Por otra parte, el impacto positivo del uso de una mejora infraestructura durante la suplementación dependió de la época de parto, posiblemente asociado a las condiciones ambientales ya que en vacas paridas en otoño la respuesta productiva y metabólica de vacas suplementadas en compost barn (CB) o a cielo abierto (OP) no presentó diferencias claras en vacas mientras paridas en primavera, el metabolismo energético a nivel del hígado se vio más comprometido en vacas PAS-OP durante lactancia media (verano). En particular, demostramos, por primera vez, que la oxidación de los ácidos grasos mitocondrial hepática para la síntesis de ATP se vio comprometida, asociada a un aumento de demanda en la síntesis endógena de glucosa, durante el estrés térmico en lactancia media, situación en que la infraestructura durante la suplementación puede tener un impacto positivo. El impacto de la exposición a las condiciones ambientales durante la suplementación en vacas en pastoreo sobre el metabolismo energético dependerá de las condiciones ambientales, así como de las condiciones de infraestructura a cielo abierto. En el año del trabajo, probablemente las precipitaciones durante el otoño-invierno, así como el buen diseño y manejo de las áreas de comida y descanso en la infraestructura a cielo ambiente limitó el impacto de la exposición al ambiente en vacas paridas en otoño. Sin embargo, en condiciones ambientales menos favorables, sucesión de olas de calor durante el verano (diciembre-febrero) por altas temperaturas y humedad, determinaron un mayor impacto de la exposición al ambiente en vacas paridas en primavera. El impacto negativo sobre el metabolismo energético de vacas suplementadas a cielo abierto, podría determinar diferencias, más allá de la respuesta en producción de leche, en las respuestas reproductivas y del sistema inmune (salud) así como en el bienestar animal. Estos resultados indican la importancia de continuar estudiando el impacto de la infraestructura durante la suplementación en distintos años (condiciones ambientales diferentes) considerando la producción, reproducción, salud y bienestar animal y a diferentes niveles. – animal y metabolismo y en particular, explorar mecanísticamente el efecto del estrés térmico sobre la regulación del metabolismo energético de manera de comprender el impacto de diferentes medidas de manejo que apunten a su minimización.

Finalmente, mostramos por primera vez que la leche contiene concentraciones micromolares de NO₂-cLA endógeno. Teniendo en cuenta que en concentraciones micromolares el NO₂-cLA es capaz de modular a nivel fisiológico la expresión génica antiinflamatoria y las respuestas metabólicas, nuestro hallazgo de NO₂-cLA presente endógenamente en la leche vacuna convierte a este ácido graso en un nutriente funcional de potencial importancia para la salud humana. A su vez, el NO₂-cLA presente endógenamente en la leche vacuna puede variar con el genotipo Holando así como el momento de lactancia. Futuros experimentos y proyectos deben dirigirse a estudiar si el NO₂-cLA lácteo aporta beneficios para la salud luego de su ingesta, lo cual podría posicionar al NO₂-cLA como un nutriente de alto interés fisiológico y nutracéutico. Las técnicas analíticas desarrolladas en este trabajo podrían ser aplicadas para la selección de genotipos, formas de alimentación y período de lactancia que aportan altos niveles de NO₂-cLA. Eventualmente, también se podría utilizar para estandarizar los niveles de NO₂-cLA en productos o subproductos lácteos comerciales

Referencias bibliográficas

- Aguerre M, Carriquiry M, Astessiano AL, Cajarville C, Repetto JL. 2015. Effect of sorghum grain supplementation on glucose metabolism in cattle and sheep fed temperate pasture. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 99(3):465-73.
- AGUERRE, M.; CAJARVILLE, C.; LA MANNA, A.; CAVESTANY, D.; MENDOZA, A.; MATTIAUDA, D.; CARRIQUIRY, M.; REPETTO, J.L.; MEIKLE, A.; CHILIBROSTE, P. 2017. Estrategias de alimentación de vacas lecheras en pastoreo: ¿qué hemos aprendido de los sistemas comerciales y qué hemos generado desde la investigación en Uruguay?. Montevideo (UY): Red Tecnológica Sectorial, 55 pp.
- Artegoitia V, Meikle A, Olazábal L, Damián JP, Adrien ML, Mattiauda D, Bermudez J, Torre A, Carriquiry M. 2012. Milk casein and fatty acid fractions in early lactation are affected by nutritional regulation of body condition score at the beginning of the transition period in primiparous and multiparous cows under grazing conditions. *Journal of Animal Physiology Animal Nutrition* 97:919-931.
- Astessiano, Al, M. Carriquiry, Da Mattiauda, Ml Adrien, P. Chilibroste, and A. Meikle. 2017. "Endometrial Gene Expression in Primiparous Dairy Cows at the End of the Voluntary Waiting Period Is Affected by Nutrition: Total Mixed Ration vs Increasing Levels of Herbage Allowance." *Reproduction in Domestic Animals*, no. March: 1–8. doi:10.1111/rda.12981.
- Astessiano, Ana Laura, Ana Meikle, Maite Fajardo, Jorge Gil, Diego Antonio Mattiauda, Pablo Chilibroste, and Mariana Carriquiry. 2015. "Metabolic and Endocrine Profiles and Hepatic Gene Expression of Holstein Cows Fed Total Mixed Ration or Pasture with Different Grazing Strategies during Early Lactation." *Acta Veterinaria Scandinavica* 57:1–12. doi:10.1186/s13028-015-0163-6.
- Bancroft, G., and Fry, E. G. (1933). Adsorption and hydrolysis of glycogen. *J. Biol. Chem.* 100, 255–265.
- Barbeito, J. (2023). Análisis de ácidos grasos nitrados en leche bovina. Tesis de maestría. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Química.
- Barca, J., Carriquiry, M., Olazabal, L., Fajardo, M., Chilibroste, P., and Meikle, A. 2017. Milk fatty acid profile from cows fed with mixed rations and different access time to pastureland during early lactation. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 2017:1-10.
- Bieber, L. L., T. Abraham, and T. Helmrath. 1972. "A Rapid Spectrophotometric Assay for Carnitine Palmitoyltransferase." *Analytical Biochemistry* 50(2): 509–18.
- Bonacci G, Ascianto E.K., Woodcock S.R., Salvatore S.R., Freeman B.A., and Schopfer F.J. 2011. Gas-phase fragmentation analysis of nitro fatty acids. *J Am Soc Mass Spectrom.* 22(9):1534-51.
- Bradford, Marion M. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Analytical Biochemistry* 72:248–54.
- Brand, Martin D, and David G Nicholls. 2011. "Assessing Mitochondrial Dysfunction in Cells" 312:297–312.
- Cañibe, G, García-Roche Saracco, M, Casal Spera, A, Jasinsky Flores, A y Carriquiry Fossemale, M. (2021)a. Composición de tejido hepático de vacas Holstein durante lactancia temprana y media, en tres sistemas de producción. EN: Congreso Asociación Uruguaya de Producción Animal (AUPA); (7°, 2021 Montevideo, Uruguay).
- Cañibe, G, García-Roche Saracco, M, Casal Spera, A, Jasinsky Flores, A y Carriquiry Fossemale, M. (2021)b. Mitochondrial function during early and late lactation, of Holstein cows under 3 different productive systems. EN: *Journal Dairy Science*, 104(Suppl.1):301.
- Cañibe, G, García-Roche Saracco, M, Casal Spera, A, Jasinsky Flores, A y Carriquiry Fossemale, M. (2022). Hepatic energy metabolism of dairy cows in grazing systems with or without environmental control during lactation. EN: *Animal - science proceedings*, 13(3):443-444
- Cañibe, M. Garcia-Roche, A. Jasinsky, M. Carriquiry. (2020) Función mitocondrial en biopsias hepáticas durante lactación temprana de vacas Holstein en tres sistemas de producción. II Bienal de SBBM, Montevideo, Uruguay.
- Cañibe G., García Roche M., Casal A., Jasinsky A. & Carriquiry M. 2023. Hepatic metabolome of grazing dairy cows with or without environmental control during lactation. *J. Dairy Sci.* 106, Suppl. 1, 77.
- Cardoso, Ariel R, Pâmela A H B Kakimoto, and Alicia J Kowaltowski. 2013. "Diet-Sensitive Sources of Reactive Oxygen Species in Liver Mitochondria?: Role of Very Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenases" 8(10):1–13.
- Carriquiry, M., W.J. Weber, S.C. Fahrenkrug, and B.A. Crooker. 2009. "Hepatic Gene Expression in Multiparous Holstein Cows Treated with Bovine Somatotropin and Fed N-3 Fatty Acids in Early Lactation." *Journal of Dairy Science* 92:4889–4900.
- Ceci, R., Duranti, G., Sgrò, P., Sansone, M., Guidetti, L., Baldari, C., Sabatini, S., & Di Luigi, L. (2015). Effects of tadalafil administration on plasma markers of exercise-induced muscle damage, IL6 and antioxidant status capacity. *European Journal of Applied Physiology*, 11:531–539.
- Chilibroste, P., D. A. Mattiauda, O. Bentancur, P. Soca, and A. Meikle. 2012. "Effect of Herbage Allowance on Grazing Behavior

- and Productive Performance of Early Lactation Primiparous Holstein Cows." *Animal Feed Science and Technology* 173:201–9. doi:10.1016/j.anifeedsci.2012.02.001.
- Chilibroste, P, P Soca, and D Mattiauda. 2011. "Balance Entre Oferta Y Demanda de Nutrientes En Sistemas Pastoriles de Producción de Leche: Potencial de Intervención Al Inicio de La Lactancia." In XXXIX Jornadas Uruguayas de Buiatría.
- Cimen, Huseyin, Min Joon Han, Yongjie Yang, Qiang Tong, Hasan Koc, and Emine C. Koc. 2010. "Regulation of Succinate Dehydrogenase Activity by SIRT3 in Mammalian Mitochondria." *Biochemistry* 49(2):304–11.
- Dillon P. 2006. Achieving High Dry-Matter Intake from Pasture with Grazing Dairy Cows. In: Elgersma, A., Ed., *Fresh Herbage for Dairy Cattle*, Springer, Berlin, 1–26.
- Dhiman TR, Anand GR, Satter LD, Pariza MW. 1999. Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. *Journal of Dairy Science*, 82:2146–2156.
- Drackley, James K. 1999. "Biology of Dairy Cows During the Transition Period: The Final Frontier?" *Journal of Dairy Science* 82:2259–73.
- Edmonson, A. J., Lean, I. J., Weaver, L. D., Farver, T., and Webster, G. (1989). A body condition scoring chart for holstein dairy cows. *J.Dairy Sci.* 72:68–78.
- Fajardo, M., D. A. Mattiauda, G. Motta, T. C. Genro, A. Meikle, M. Carriquiry, and P. Chilibroste. 2015. "Use of Mixed Rations with Different Access Time to Pastureland on Productive Responses of Early Lactation Holstein Cows." *Livestock Science* 181:51–57.
- Ferreira AM, Ferrari MI, Trostchansky A, Batthyany C, Souza JM, Alvarez MN, et al. 2009. Macrophage activation induces formation of the anti-inflammatory lipid cholesteryl-nitrolinoleate. *Biochem J.* 417(1):223–34
- Fiehn, O. 2016. Metabolomics by gas chromatography-mass spectrometry: Combined targeted and untargeted profiling. *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3004s114>
- Fulkerson, W J, T M Davison, S C Garcia, G Hough, M E Goddard, R Dobos, and M Blockey. 2008. "Holstein-Friesian Dairy Cows Under a Predominantly Grazing System: Interaction Between Genotype and Environment." *Journal of Dairy Science* 91:826–39.
- García SC. 2002. Desafíos y oportunidades para el establecimiento de sistemas estacionales de producción de leche en Argentina y Uruguay. XXX Jornadas Uruguayas de Buiatría. pp:15–21.
- Garcia-Roche, Mercedes, Alberto Casal, Mariana Carriquiry, Rafael Radi, Celia Quijano, and Adriana Cassina. 2018. "Respiratory Analysis of Coupled Mitochondria in Cryopreserved Liver Biopsies." *Redox Biology* 17:207–12. doi:10.1016/j.redox.2018.03.008.
- García-Roche M, Casal A, Mattiauda DA, Ceriani M, Jasinsky A, Mastrogiovanni M, Trostchansky A, Carriquiry M, Cassina A, Quijano C. Impaired hepatic mitochondrial function during early lactation in dairy cows: Association with protein lysine acetylation. *PLoS One.*14(3):e0213780.doi: 10.1371/journal.pone.0213780.
- Garcia-Roche, M., G. Cañibe, A. Casal, DA Mattiauda, M. Ceriani, A. Jasinsky, A Cassina, C. Quijano and M. Carriquiry. 2021. "Glucose and Fatty Acid Metabolism of Dairy Cows in a Total Mixed Ration or Pasture-Based System During Lactation" *Frontiers in Animal Science* 2:5, <https://doi.org/10.3389/fanim.2021.622500>
- García-Roche Saracco, M. 2022. Adaptaciones metabólicas en vacas lecheras de distintos genotipos holstein bajo dos estrategias de alimentación. Tesis de doctorado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Agronomía. Unidad de Posgrados y Educación Permanente.
- García-Roche M, Talmón D, Cañibe G, Astessiano AL, Mendoza A, Quijano C, Cassina A, Carriquiry M. 2022. Differential hepatic mitochondrial function and gluconeogenic gene expression in 2 Holstein strains in a pasture-based system. *J Dairy Sci.* 105(7):5723–5737. doi: 10.3168/jds.2021-21358
- García-Roche M, Talmón D, Cañibe G, Astessiano AL, Mendoza A, Cassina A, Quijano C, Carriquiry M. 2023. Hepatic metabolism of grazing cows of two Holstein strains under two feeding strategies with different levels of pasture inclusion. *PLoS One* 18(10):e0290551. doi: 10.1371/journal.pone.0290551
- Gonzalez-Perilli L, Alvarez MN, Prolo C, Radi R, Rubbo H, Trostchansky A. Nitroarachidonic acid prevents NADPH oxidase assembly and superoxide radical production in activated macrophages. *Free Radic *
- Ingvartsen, K. L., and K. Moyes. 2013. "Nutrition, Immune Function and Health of Dairy Cattle." *Animal* 7 (s1): 112–22. doi:10.1017/S175173111200170X.
- Instituto Nacional de La Leche, Uruguay. n.d. <http://www.inale.org/innovaportal/v/3204/4/innova.front/uruguay-lechero.html>.
- Jorge-Smeding E, Carriquiry M, Casal A, Armand-Ugon D, Mastrogiovanni M, Trostchansky A, Mendoza A, Astessiano AL. 2023. Energy, protein and redox metabolism underlying adaptive responses in New Zealand versus North American Holstein cows in pasture-based dairy systems. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 107(3):754–768. doi: 10.1111/jpn.13766
- Jorge-Smeding E, M. Carriquiry, H. Naya, A. Mendoza and A.L. Astessiano. 2021. A new integrative mathematic approach to

study metabolic trajectories of grazing dairy cows. Proceedings EAAP–72nd Annual Meeting, Davos, Switzerland.

Kendrick, Agnieszka A, Mahua Choudhury, Shaikh M Rahman, Carrie E McCurdy, Marisa Friederich, Johan L K Van Hove, Peter A Watson, et al. 2011. "Fatty Liver Is Associated with Reduced SIRT3 Activity and Mitochondrial Protein Hyperacetylation." *The Biochemical Journal* 433:505–14.

Kolver, ES and Muller, LD. 1998. "Performance and nutrient intake of high producing Holstein cows consuming pasture or a total mixed ration". *Journal of Dairy Science* 81(5):1403-1411.

Kolver, E S, a R Napper, P J a Copeman, and L D Muller. 2000. "A Comparison of New Zealand and Overseas Holstein Friesian Heifers." *New Zealand Society of Animal Production* 60:265–69.

Kolver, E S, J R Roche, M J De Veth, P L Thorne, and A R Napper. 2002. "Total Mixed Ratios versus Pasture Diets. Evidence for a Genotype X Diet Interaction in Dairy Cow Performance." *Proc New Zeal Soc An* 62:246–51.

Koo, Seung-Hoi, Hiroaki Satoh, Stephan Herzig, Chih-Hao Lee, Susan Hedrick, Rohit Kulkarni, Ronald M Evans, Jerrold Olefsky, and Marc Montminy. 2004. "PGC-1 Promotes Insulin Resistance in Liver through PPAR- γ -Dependent Induction of TRB-3." *Nature Medicine* 10 (5):530–34.

Lucy, M C, G A Verkerk, B E Whyte, K A Macdonald, L Burton, R T Cursons, J R Roche, and C W Holmes. 2009. "Somatotrophic Axis Components and Nutrient Partitioning in Genetically Diverse Dairy Cows Managed under Different Feed Allowances in a Pasture System." *Journal of Dairy Science* 92:526–39.

McCarthy, S D, S M Waters, D a Kenny, M G Diskin, R Fitzpatrick, J Patton, D C Wathes, and D G Morris. 2010. "Negative Energy Balance and Hepatic Gene Expression Patterns in High-Yielding Dairy Cows during the Early Postpartum Period: A Global Approach." *Physiological Genomics* 42A (3):188–99.

Mendoza, A, Cajarville, C, Repetto, J. 2016. "Short communication: Intake, milk production, and milk fatty acid profile of dairy cows fed diets combining fresh forage with a total mixed ration". *Journal of Dairy Science* 99(3):1938-1944.

Nassir, Fatiha, and Jamal Ibdah. 2014. "Role of Mitochondria in Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *International Journal of Molecular Sciences* 15(5):8713–42.

PEREIRA I.; LABORDE D.; CARRIQUIRY M.; LOPEZ-VILLALOBOS N.; MEIKLE A. 2010a. Productive and reproductive efficiency comparison between Uruguayan Holstein and Uruguayan Holstein x New Zealand Holstein Friesian cows in a commercial farm in Uruguay. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, v.: 10, p.: 306 - 310, 2010

PEREIRA I.; LABORDE D.; CARRIQUIRY M.; LOPEZ-VILLALOBOS N.; MEIKLE A. 2010b. Blood metabolic profiles in Uruguayan Holstein and Uruguayan Holstein x New Zealand Holstein-Friesian dairy cows. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, v.: 70, p.: 311 - 315, 2010

Schweigert, F. J., Klingner, J., Hurtienne, A., & Zunft, H. J. (2003). Vitamin A, carotenoid and vitamin E plasma concentrations in children from Laos in relation to sex and growth failure. *Nutrition Journal*, 2(1), 17.

Skibieli, AL. 2022 Hepatic mitochondrial bioenergetics and metabolism across lactation and in response to heat stress in dairy cows, *JDS Communications*, <https://doi.org/10.3168/jdsc.2023-0432>.

TALMON D., GARCÍA ROCHE M., MENDOZA A., MATTIAUDA D. & CARRIQUIRY M. 2020. Energy partitioning and energy efficiency of two Holstein genotypes under a mixed pasture-based system during mid and late lactation. *Livestock Science*. 239 #104166, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104166>

Trostchansky A, Souza JM, Ferreira A, Ferrari M, Blanco F, Trujillo M, et al. Synthesis, isomer characterization, and anti-inflammatory properties of nitroarachidonate. *Biochemistry*. 2007;46(15):4645-53

Wei, Yongzhong, R Scott Rector, John P Thyfault, and Jamal A Ibdah. 2008. "Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Mitochondrial Dysfunction" 14 (2): 193–99.

Wheelock JB, Rhoads RP, Vanbaale MJ, Sanders SR, Baumgard LH. 2010. Effects of heat stress on energetic metabolism in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci*. 93(2):644-55.

Wernicki, A., Urban-Chmiel, R., Puchalski, A., & Tokarzewska, S. (2006). Evaluation of plasma cortisol and TBARS levels in calves after short term transportation. *Revue Médecine Vétérinaire*, 157(1), 30–34.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)