

## **CAMBIOS EN LOS NIVELES SANGUÍNEOS DE VITAMINAS A Y E SELENIO, LEUCOCITOS Y EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN PARA MIGRACIÓN EN NEUTRÓFILOS EN VACAS LECHERAS ALREDEDOR DEL PARTO**

**Meglia, G.E.<sup>1,2</sup>; Johannisson, A.<sup>2</sup>; Petersson, L.<sup>2</sup> y Persson Waller, K.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Departamento de Producción Animal, Cátedra Producción Bovinos de Leche, Calle 5 esquina 116, General Pico (6360) La Pampa, *gmeglia@hotmail.com* Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam.

<sup>2</sup> Department of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.

### **RESUMEN**

La susceptibilidad a las enfermedades infecciosas, tales como la mastitis, en vacas lecheras es muy alta durante el período alrededor del parto. Los mecanismos de defensa del animal están disminuidos desde aproximadamente tres semanas antes del parto hasta tres semanas después del mismo. Las causas no son claras, sin embargo, ocurren una serie de cambios metabólicos y hormonales durante este período, los cuales pueden influir negativamente sobre el sistema inmunitario. En este ensayo se tomaron muestras de sangre de diez vacas lecheras (raza Roja y Blanca Sueca) un mes antes del parto, al parto y un mes después del mismo. Las concentraciones séricas de vitaminas A y E, y los niveles de selenio (Se) en sangre fueron analizados, como así también el número y diferenciación leucocitarios, y la presencia de moléculas de adhesión para migración CD62L y CD18 en neutrófilos.

Los niveles de vitaminas A y E disminuyeron significativamente al parto, mientras que los de Se aumentaron. En este momento también fue detectada una leucocitosis, explicada por neutrofilia y linfopenia. Las proporciones de neutrófilos positivos a CD62L disminuyeron significativamente al parto. Los cambios observados en los niveles sanguíneos de vitaminas y Se fueron principalmente en respuesta a la formación de calostro, a cambios en la ingesta de materia seca y a el metabolismo ruminal. Los bajos niveles de vitaminas A y E pueden tener efectos negativos en el funcionamiento del sistema inmunitario. Las menores proporciones de neutrófilos positivos a CD62L al parto resultarían en menor migración hacia los tejidos, contribuyendo a un aumento en la susceptibilidad a enfermedades, como mastitis.

**Palabras claves:** vacas lecheras, inmunidad, leucocitos, vitaminas, selenio

### **SUMMARY**

**Changes in blood vitamins A and E, selenium, leukocytes and neutrophil expression of adhesion molecules in dairy cows around parturition**

Blood samples from ten Swedish dairy cows were taken one month before calving, at calving, and one month after calving. The blood concentration of vitamins A and E, and the trace element selenium (Se) were analysed, as well as the total and differential white blood cell counts, and the presence of CD62L and CD18 adhesion molecules on blood neutrophils.

The levels of vitamins A and E decreased significantly at calving, while whole blood Se increased. Leukocytosis was detected at calving, explained mainly by neutrophilia. The number of lymphocytes tended to decrease at calving. The proportion of CD62L<sup>+</sup> neutrophils decreased significantly at this time.

The observed changes in blood levels of vitamins and Se were mainly in response to colostrum formation, changes in dry matter intake, and ruminal metabolism around calving. Decreased levels of vitamins A and E at calving might have negative implications for the functions in the immune defence. The lower proportion of CD62L<sup>+</sup> neutrophils at calving may result in less migration of blood neutrophils into the tissues, and might contribute to the increased susceptibility to diseases at this time.

**Key words:** dairy cows, immunity, leukocytes, vitamins, selenium

## INTRODUCCIÓN

La susceptibilidad de las vacas lecheras a las enfermedades infecciosas, tales como mastitis, es más alta durante el período alrededor del parto que en cualquier otro momento de la lactancia (Oliver y Mitchell, 1983). Los mecanismos de defensa del animal están deprimidos desde aproximadamente tres semanas antes del parto hasta tres semanas después del mismo (Mallard et al., 1998). Las causas no son claras. Sin embargo, ocurren una serie de cambios hormonales y metabólicos durante este período, los cuales pueden influir negativamente sobre el sistema inmunitario (Smith et al., 1973; Kehrli et al., 1998).

Los neutrófilos son considerados la primer línea de defensa celular contra los patógenos. No obstante, al parto importantes funciones, tales como migración y fagocitosis están disminuidas (Hill, 1981; Kehrli et al., 1989). De la misma manera, la expresión de las moléculas de adhesión CD62L (L-selectina) y CD11/CD18 o  $\beta_2$ -integrina en los neutrófilos son de vital importancia para la migración a los sitios de inflamación (Hynes, 1987; Gahmberg et al. 1998). Sin embargo, recientes informes indicaron una menor expresión de estas moléculas de adhesión al parto, dificultando aún más el poder de defensa de los neutrófilos (Lee y Kehrli, 1998).

El status nutricional de los animales ha sido asociado con la habilidad de resistir infecciones. Durante el período alrededor del parto se informaron importantes reducciones en las concentraciones sanguíneas de vitaminas A y E (Goff y Stabel, 1990). Estos nutrientes han demostrado tener efecto sobre la funcionalidad del sistema inmunitario

(Sordillo y Scott, 1995). Una elevada incidencia de mastitis fue hallada al parto cuando las concentraciones de estas vitaminas estaban disminuidas (Oldham et al., 1991; Politis et al., 1995). De la misma manera, el Se parece tener un importante rol en prevenir disfunciones del sistema inmune (Smith et al., 1997).

Los objetivos de este estudio fueron evaluar la variación en el número de leucocitos, en la expresión de las moléculas de adhesión CD62L y CD18 en neutrófilos, como así también los cambios sanguíneos del Se y de las vitaminas A y E durante el periodo alrededor del parto en vacas lecheras.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Diez vacas lecheras de la raza Roja y Blanca Sueca fueron monitoreadas desde un mes antes del parto hasta un mes después del mismo. Los animales se encontraban entre su segunda y sexta lactancia. Las pariciones se produjeron en el periodo marzo-abril y las vacas recibieron una dieta ad libitum basada en silo de pastura, concentrado y heno de pastura. Además, se adicionó un núcleo vitamínico mineral a la dieta, a razón de 150 g/día.

Las muestras de sangre fueron tomadas siempre por la mañana, un mes antes del parto, al parto (dentro de las 24 horas) y un mes después del mismo. Por cada animal se sacaron tres muestras de sangre. Sangre con heparina fue usada para la obtención de plasma y eritrocitos donde se determinó Se. Sangre con EDTA se empleó para el aislamiento de neutrófilos en los cuales se evaluaron la expresión de las moléculas de adhesión CD18 y CD62L y para el número y diferenciación

leucocitaria. Mientras que sangre sin agregados de aditivos fue usada para la obtención de suero en el cual se determinaron las concentraciones de vitaminas A y E.

Las vitaminas A y E fueron extraídas de las muestras de suero con hexano y la separación fue hecha por Cromatografía Líquida de Alta Performance (de acuerdo al procedimiento estándar del Departamento de Química, Instituto Nacional de Veterinaria (SVA), Uppsala, Suecia). Las concentraciones de Se en plasma y eritrocitos fueron determinadas por Espectrofotometría de Absorción Atómica (Galgan y Frank, 1993). El contenido de Se en sangre total fue calculado a partir del Se plasmático y eritrocitario asumiendo un valor promedio de hematocrito del 35% (Schalm, 1986).

El número y diferenciación leucocitarias fueron determinados usando un contador automático (Cell Dyn<sup>R</sup>3500), mientras que para la determinación de las moléculas de adhesión CD18 y CD62L en neutrófilos se usaron anticuerpos monoclonales (mAbs). Para tal motivo, primero se lisaron los eritrocitos con cloruro de amonio y luego fueron lavados tres veces con solución buffer de fosfato (PBS) sin Ca y Mg, antes del procedimiento de tinción. Para identificar leucocitos positivos a CD45 (CD45<sup>+</sup>) llevando el otro marcador de interés (CD62L y CD18) fue usado un doble procedimiento de tinción como describen Colditz et al. (1996). Las células teñidas fueron analizadas por Citometría de Flujo (FACstar Plus flow cytometry, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Mountain View, LA, USA) con un equipo óptico standard usando un láser de argón. Los datos fueron analizados por el software Cellquest versión 1.2.2 (Becton Dickinson Immunocytometry Systems), donde fueron contadas un total de 30000 células por muestra.

Para comparar las concentraciones de nutrientes, leucocitos, y las proporciones de las moléculas de adhesión en neutrófilos en los distintos momentos del ensayo se utilizó un análisis de varianza (ANOVA, una vía). Posteriormente las medias fueron evaluadas por el test de comparación de medias (LSD), con un nivel de significancia

de  $p < 0,05$ . Los resultados son presentados como media  $\pm$  error estándar de la media.

## RESULTADOS

El número total de leucocitos fue significativamente ( $p < 0,05$ ) más elevado al parto ( $8,7 \pm 0,48 \times 10^9/l$ ) que un mes antes ( $6,3 \pm 0,48 \times 10^9/l$ ) y después ( $7,2 \pm 0,48 \times 10^9/l$ ) del mismo. Esto fue principalmente debido a un incremento significativo en el número de neutrófilos, alcanzando valores ( $4,7 \pm 0,43 \times 10^9/l$ ) sobre el rango normal de referencia ( $0,6-4,0 \times 10^9/l$ ), y en menor medida a un incremento significativo en el número de monocitos ( $1,3 \pm 0,1 \times 10^9/l$ ). El número de linfocitos no difirió significativamente entre los muestreos, pero alcanzo valores por debajo del rango normal de referencia ( $2,5-7,5 \times 10^9/l$ ) al parto ( $2,2 \pm 0,21 \times 10^9/l$ ). (Figura 1).

Las proporciones de neutrófilos positivos a CD18 se mantuvo relativamente constante, registrándose un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) un mes después del parto ( $99,06 \pm 0,7$ ) comparado con un mes antes del mismo ( $97,26 \pm 0,8$ ). No obstante las proporciones de neutrófilos positivos a CD62L fueron significativamente ( $p < 0,05$ ) menores al parto ( $89,3 \pm 3,5$ ) que antes ( $99,5 \pm 3,5$ ) y después del mismo ( $98,1 \pm 2,9$ ). (Figura 2).

Los niveles de vitamina A registraron cambios significativos ( $p < 0,001$ ) durante el periodo experimental. Las concentraciones fueron significativamente menores al parto, alcanzando valores de ( $0,23 \pm 0,02$  mg/l) considerados marginales (Puls, 1994), que antes ( $0,35 \pm 0,02$  mg/l) o después del mismo ( $0,40 \pm 0,02$  mg/l). De la misma manera los niveles de vitamina E tendieron ( $p = 0,065$ ) a disminuir al momento de la parición ( $3,53 \pm 0,34$  mg/l) y fueron significativamente ( $p < 0,05$ ) mayores un mes después del parto ( $5,84 \pm 0,3$  mg/l) que antes del mismo ( $4,50 \pm 0,3$  mg/l). (Figura 3).

La concentración de Se en plasma, en eritrocitos y en sangre cambió significativamente ( $p < 0,05$ ) durante el período experimental. Los niveles de Se en sangre fueron significativamente ( $p < 0,05$ )

mayores al parto ( $0,180 \pm 0,006$  mg/kg) que antes ( $0,167 \pm 0,006$  mg/kg) y después del mismo ( $0,168 \pm 0,006$  mg/kg). El contenido de Se eritrocitario fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) al parto ( $0,35 \pm 0,006$  mg/kg) que antes del mismo ( $0,32 \pm 0,006$  mg/kg) mientras, que el Se plasmático fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) al parto ( $0,088 \pm 0,002$  mg/kg) que después del mismo ( $0,080 \pm 0,002$  mg/kg). (Figura 4).

## DISCUSIÓN

En acuerdo con Lee y Kehrlí (1998), nosotros detectamos un incremento significativo en el número de células blancas al parto. Esto fue debido principalmente a un aumento en el número de neutrófilos circulantes, y en menor medida, a monocitosis. Al parto, los niveles de corticoesteroides están elevados (Smith et al., 1973). Los corticoesteroides inducen neutrofilia por un incremento en la demarginación de estas células de la pared de los vasos sanguíneos y en menor medida a la salida de neutrófilos de la médula ósea (Guidry et al., 1976; Lee y Kehrlí, 1998). En el presente trabajo, se detectó que las proporciones de neutrófilos positivos a CD62L estaban disminuidas al parto. Una menor expresión de estas moléculas de adhesión significa que el pool de neutrófilos marginantes a lo largo de los vasos sanguíneos, se mudara hacia la corriente sanguínea central contribuyendo con la leucocitosis. Como resultado, una menor cantidad de neutrófilos estarán disponibles para migrar a los tejidos.

Los niveles séricos de vitaminas A y E mostraron una marcada disminución al parto en concordancia con informes anteriores (Goff y Stabel, 1990; Weiss et al., 1990). La disminución en las concentraciones séricas de estos nutrientes es asociada con un perjuicio en el sistema inmunitario y con una mayor incidencia de enfermedades, tal como mastitis (Reddy y Frey, 1990; Sordillo et al., 1995). Esta disminución es principalmente debido a la formación de calostro (Goff y Stabel, 1990), pero también pueden influir los cambios en la ingesta de materia seca y el metabolismo ruminal (Weiss et al., 1994). Tal es el caso de la vitamina A, donde su

destrucción ruminal es influenciada por el nivel de concentrado en la dieta (Rode et al., 1990; Weiss et al., 1995).

Algunos estudios han demostrado una relación entre el status de Se de los animales alrededor del parto con la respuesta inmune y la resistencia a enfermedades (Gyang et al., 1984; Smith et al., 1997). De estos estudios se puede concluir que el efecto benéfico de la suplementación con Se sólo ocurre cuando son cubiertas las deficiencias de este mineral. Jukola et al. (1996) recomiendan que los valores sanguíneos de Se deben estar en niveles alrededor de  $0,18$  mg/kg para prevenir enfermedades de la ubre, mientras que si las concentraciones suben de  $0,2$  mg/kg la incidencia de mastitis clínica aumenta. En el presente trabajo, las concentraciones sanguíneas de Se estuvieron en el rango de  $0,167$ - $0,180$  mg/kg, lo cual está de acuerdo con anteriores recomendaciones (Jukola et al., 1996; Smith et al., 1997).

## CONCLUSIONES

La menor proporción de neutrófilos positivos a CD62L durante el parto sugiere que una menor cantidad de estas células puede migrar a los tejidos, resultando en una reducida capacidad de defensa del animal frente a enfermedades. Además, fueron detectadas bajas concentraciones de vitaminas A y E, pudiendo acarrear consecuencias negativas sobre el funcionamiento del sistema inmunitario.

A pesar que la vitamina A fue suministrada de acuerdo a las recomendaciones, y la vitamina E por encima de los niveles recomendados, el nivel de ambos nutrientes disminuyó al parto. Los niveles de vitamina A cayeron por debajo de los parámetros normales de referencia, mientras que los valores de vitamina E se mantuvieron dentro de parámetros normales. Varios autores (Hogan et al., 1993; Weiss et al., 1997; Weiss et al., 1998) han informado mejoras en producción de leche, respuesta inmune y sanidad de la ubre, cuando los animales fueron alimentados con niveles de vitaminas A y E superiores a los recomendados por el National Research

Council (NRC, 1989). En consecuencia, los resultados del presente trabajo, en combinación con los trabajos de Hogan et al (1993), Weiss et al (1997) y Weiss et al

(1998), sugieren que las recomendaciones de vitaminas A y E del NRC no son adecuadas, al menos durante el parto.

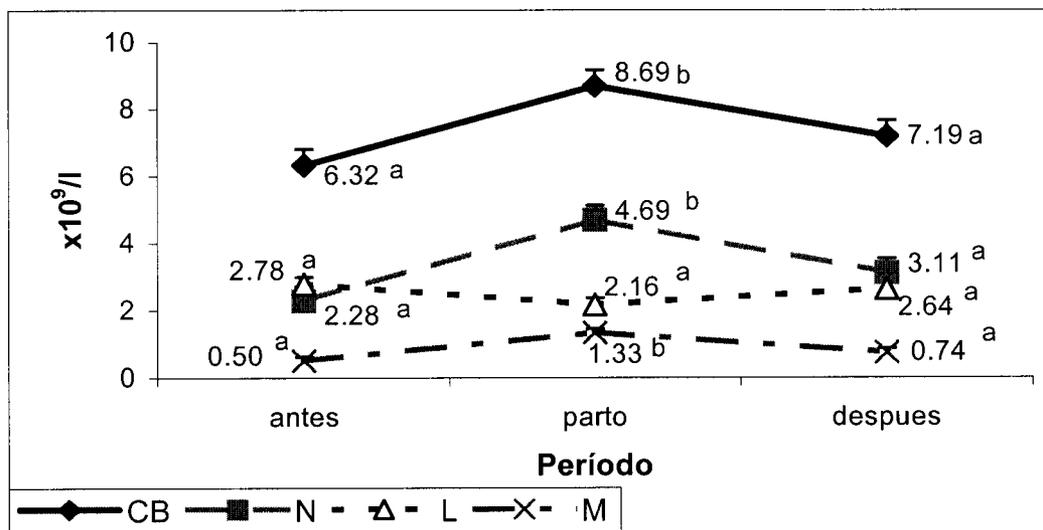


Figura 1. Cambios en los niveles sanguíneos de Células Blancas (CB), Neutrófilos (N), Linfocitos (L) y Monocitos (M) expresados como números de células  $\times 10^9/l$ , en diez vacas lecheras durante un mes antes del parto (antes), al parto (parto) y un mes después del mismo (después). Letras diferentes a, b, c dentro de cada parámetro difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

mes después del mismo (después). Letras diferentes a, b, c dentro de cada parámetro difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

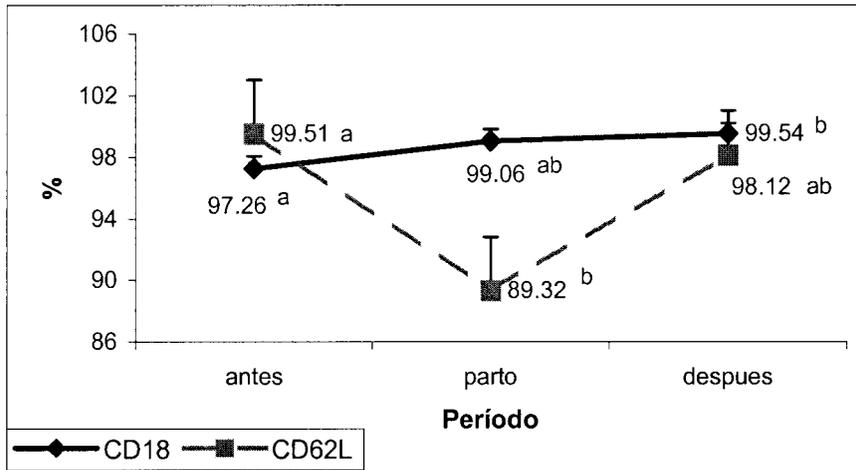


Figura 2. Cambios en las proporciones de CD18 y CD62L en neutrófilos sanguíneos, en diez vacas lecheras un mes antes del parto (antes), al parto (parto) y un mes después del mismo (después). Letras diferentes a, b, c dentro de cada parámetro difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

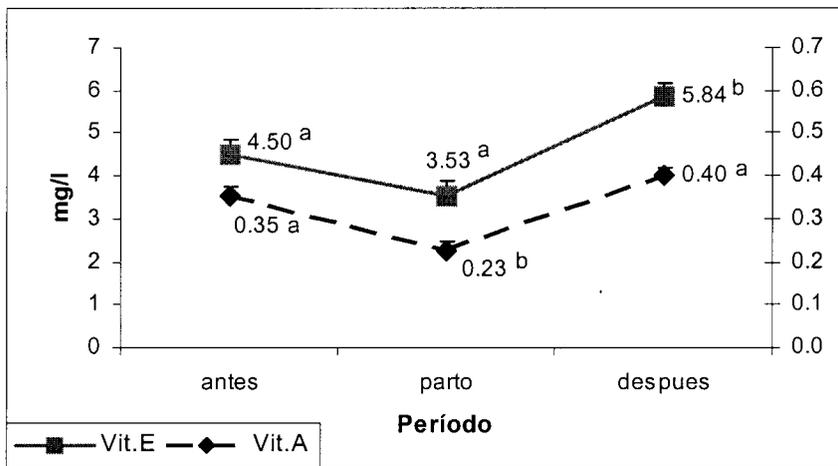


Figura 3. Cambios en las concentraciones séricas de vitaminas A y E, en diez vacas lecheras durante un mes antes del parto (antes), al parto (parto) y un mes después del mismo (después). Letras diferentes a, b, c, dentro de cada parámetro difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

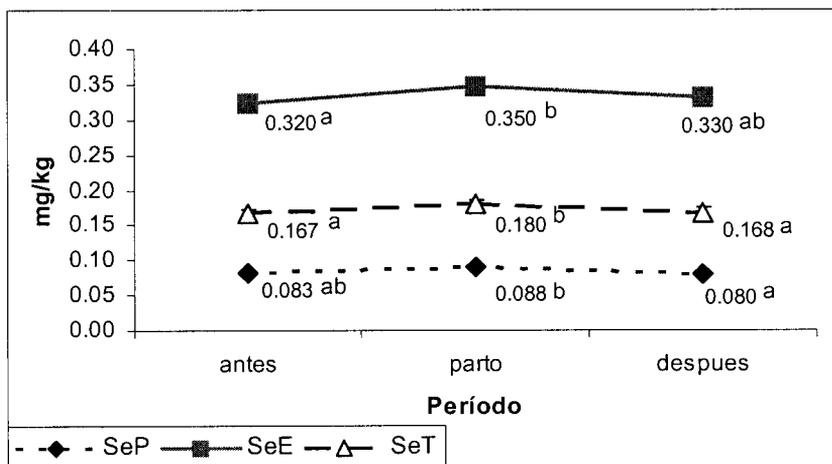


Figura 4. Cambios en las concentraciones plasmáticas (SeP), eritrocitaria (SeE) y sanguíneo (SeT) de selenio en diez vacas lecheras durante un mes antes del parto (antes), al parto (parto) y un mes después del mismo (después). Letras diferentes a, b, c, dentro de cada parámetro difieren significativamente ( $p < 0.05$ ).

## BIBLIOGRAFÍA

**COLDITZ, I. G.; EISEMANN, C. H.; TELLAM, R. L.; MCCLURE, S. J.; MORTIMER, S. I. AND HUSBAND, A. J.** -1996- Growth of *Lucilia cuprina* larvae following treatment of sheep divergently selected for fleece rot and fly strike with monoclonal antibodies to T lymphocyte subsets and interferon  $\gamma$ . *Int. J. Parasitol.* 26: 775-782.

**GAHMBERG, C. G.; VALMU, L.; FAGERHOLM, P.; KOTOVUORI, P.; IHANUS, E.; TIAN, L. AND PESSA-MORIKAWA, T.** -1998-. Leukocyte integrins and inflammation. *Cell Mol. Life Sci.* 54: 549-555.

**GALGAN, V. AND FRANK, A.** -1993- Notes and comments of the determination of selenium in biological materials. *Now. J. Anim. Sci.* 11: 57-74.

**GOFF, J. P. AND STABEL, J. R.** -1990-. Decreased plasma retinol,  $\alpha$ -tocopherol, and zinc concentration during the peripartum period: effect of milk fever. *J. Dairy Sci.* 73: 3195-3199.

**GUIDRY, A. J.; PAAPE, M. J.; PEARSON, R. E.** -1976- Effects of parturition and lactation on blood and milk cell concentrations, corticosteroids, and neutrophils phagocytosis in the cow. *Am. J. Vet. Res.* 37: 1195-1200.

**GYANG, E. A.; STEVENS, J. B.; OLSON, W. G.; TSITSAMIS, S. D. AND USENIK, E. A.** -1984- Effects of selenium-vitamin E injection on bovine polymorphonucleated leukocytes phagocytosis and killing *Staphylococcus aureus*. *Am. J. Vet. Res.* 45: 175-177.

**HILL, A. W.** -1981-. Factors influencing the outcome of *Escherichia Coli* mastitis in the dairy cows. *Res. Vet. Sci.* 31: 107-112.

**HOGAN, J. S.; WEISS, W. P.; TODHUNTER, D. A. AND SMITH, K. L.** -1993- Role of vitamin E and selenium in host defense against mastitis. *J. Dairy Sci.* 76: 2795-2803.

- HYNES, R. O.** -1987-. Integrins: A family of cell surface receptors. *Cell*. 48: 549-554.
- JUKOLA, E.; HAKKARAINEN, J.; SALONIEMI, H. AND SANKARI, S.** -1996- Blood selenium, vitamin E, vitamin A, and  $\beta$ -carotene concentrations and udder health, fertility treatments, and fertility. *J. Dairy Sci.* 79: 838-845.
- KEHRLI JR, M. E.; KIMURA, K.; GOFF, G. P.; STABEL, G. R. AND NONNECKE, B. J.** -1998-. Periparturient immunosuppression in dairy cows: nutrition and lactation effects. *Production Diseases in Farm Animals*. 10<sup>th</sup> International Conference 1998. Ed Th Wensing. The Netherlands.
- KEHRLI JR, M. E.; NONNECKE, B. J. AND ROTH, J. A.** -1989-. Alterations in bovine neutrophil function during the peripartum period. *Am. J. Vet. Res.* 50: 207-214.
- LEE, E-K. AND KEHRLI, M.** -1998- Expression of adhesion molecules on neutrophils of periparturient cows and neonatal calves. *Am. J. Vet. Res.* 59: 37-43.
- MALLARD, B. A.; DEKKERS, J. C.; IRELAND, M. J.; LESLIE, K. E.; SHARIF, S.; LACEY VANJAMPEN, C.; WAGTER, L. AND WILKIE, N.** -1998-. Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. *J. Dairy Sci.* 81: 585-595.
- OLDHAM, E. R.; EBERHART, R. J. AND MULLER, L. D.** -1991-. Effects of supplemental vitamin A and  $\beta$ -carotene during the dry period and early lactation on udder health. *J. Dairy Sci.* 74: 3775-3781.
- OLIVER, S. P. AND MITCHELL, B. A.** -1983-. Susceptibility of bovine mammary gland to infections during the dry period. *J. Dairy Sci.* 66: 1162-1166.
- POLITIS, I.; HIDIROGLOU, M.; BATRA, T. R.; GILMORE, J. A.; GOREWIT, R. C. AND SCHERF, H.** -1995-. Effects of vitamin E on immune function of dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 56: 179-184.
- PULS, R.** -1994- Vitamins levels in animal health. 1<sup>st</sup> Ed. Sherpa International. Canada. -1990- Nutritional modulation of immunity in domestic food animals. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 35: 255-281.
- RODE, L. M.; MCALLISTER, T. A. AND CHENG, K-J.** -1990- Microbial degradation of vitamin A in rumen fluid from steers fed concentrate, hay or straw diets. *Can. J. Anim. Sci.* 70: 227.
- SCHALM, O. W.** -1986- Cattle: Normal hematology with comments on response to disease. *Veterinary Hematology*. Jain, N. C. Philadelphia, USA.
- SMITH, K. L.; HOGAN, J. S. AND WEISS, W. P.** -1997-. Dietary vitamin E and selenium affect mastitis and milk quality. *J. Anim. Sci.* 75: 1659-1665.
- SMITH, V. G.; EDGERTON, L. A.; HAFS, H. D. AND CONVEY, E. M.** -1973-. Bovine serum estrogens, progestins and glucocorticoids during late pregnancy parturition and early lactation. *J. Anim. Sci.* 36: 391-396.
- SORDILLO, L. M. AND SCOTT, N. L.** -1995-. Alternative approaches for the prevention and treatment of mastitis. *Bov. Proceed.* 27: 54-60.
- WEISS, W. P.; HOGAN, J. S.; SMITH, K. L. AND HOBLET, K. H.** -1990- Relationships among selenium, vitamin E and mammary gland health in commercial dairy herds. *J. Dairy Sci.* 73: 381-390.
- WEISS, W. P.; HOGAN, J. S.; SMITH, K. L. AND WILLIAMS, S. N.** -1994- Effect of dietary fat and vitamin E on  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene in blood of peripartum cows. *J. Dairy Sci.* 77: 1422-1429.
- WEISS, W. P.; HOGAN, J. S.; TODHUNTER, D. A. AND SMITH, K. L.** -1997- Effect of vitamin E supplementation in diets with a low concentration of selenium on mammary gland health of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80: 1728-1737.-

1995- Effect of forage to concentrate ratio on disappearance of vitamin A and E during in vitro ruminal fermentation. *J. Dairy Sci.* 78: 1837-1842.

**WEISS, W. P.** -1998- Requirements of fat-soluble vitamins for dairy cows: A review. *J. Dairy Sci.* 81: 2493-2501.