

PROYECTO DE TESIS DE DOCTORADO EN SALUD ANIMAL

**MARCADORES METABÓLICOS E INFLAMATORIOS DURANTE EL PERÍODO DE
TRANSICIÓN EN VACAS LECHERAS COMO HERRAMIENTAS DIAGNÓSTICAS DE
SALUD DE RODEO**

AUTOR: Gretel Cristina Ruprechter Schölderle
DIRECTORA DE TESIS: Mirela Noro
CO-DIRECTORES: José Luis Repetto y María de Lourdes Adrien

Mayo 2015

RESUMEN

La intensificación de la producción aumenta la susceptibilidad de las vacas lecheras de presentar enfermedades metabólicas e infecciosas en el periparto. En Uruguay, la producción de leche individual ha aumentado en promedio de 15.7 a 19 litros/vaca/día, desde los años 2004 a 2013 (DIEA 2013), pero la información respecto a la salud de rodeos lecheros es prácticamente nula. Conocer la presentación de las enfermedades del periparto como la hipocalcemia, cetosis, mastitis, metritis, retención de placenta o desplazamiento de abomaso e investigar los factores de riesgo para la ocurrencia de las mismas en las vacas es la base para la medicina preventiva. Además, determinar cuáles son las mejores variables sanguíneas a ser medidas, su sensibilidad y puntos de corte resulta imperioso para realizar un buen diagnóstico en vacas, tema no evaluado en países con predominio de sistemas de producción pastoriles mixtos. Los objetivos de este proyecto son, caracterizar la concentración sanguínea de metabolitos (ácidos grasos no esterificados, beta-hidroxibutirato, calcio, colesterol), hormonas (insulina, factor de crecimiento similar a insulina tipo I), citoquinas (factor de necrosis tumoral, interleuquinas I y 6, adiponectina), y marcadores inflamatorios (paraoxonasa, haptoglobina) en dos grupos de vacas sometidas a sistemas de alimentación contrastante (dieta pastoril-mixta vs dieta totalmente mezclada). Además, estudiar durante el período de transición de vacas lecheras, algunos factores de riesgo para la presentación de las enfermedades del periparto como por ejemplo el grado de reservas corporales o la paridad y establecer puntos de corte y valor diagnóstico de todas las variables mencionadas anteriormente, para predecir riesgo de enfermedad. También se pretende evaluar el impacto de las enfermedades sobre la producción láctea, reproducción o toma de decisión de descartar vacas. Para cumplir los objetivos se realizarán 2 trabajos. Primeramente en un predio experimental, se estudiará el efecto del sistema de alimentación. Las vacas (n=42) serán sometidas a 2 tratamientos postparto (n=21 por tratamiento), T1= pastoreo-mixto y T2= Estabulación (dieta totalmente mezclada) y se les realizará un seguimiento del estatus metabólico, hormonal y productivo. Se obtendrán muestras sanguíneas desde el mes antes del parto, hasta los 270 días posparto. Se determinará la producción láctea diaria y cada 15 días se evaluará la condición corporal. En sangre se determinará, la concentración de los metabolitos, hormonas y marcadores inflamatorios mencionados previamente. En el segundo trabajo, se realizará un relevamiento en dos predios comerciales, uno estabulado (700 vacas en ordeño) y otro pastoril-mixto (1000 vacas en ordeño). En cada predio se seleccionarán 300 vacas (multíparas y primíparas) en el preparto y se realizará el estudio desde -2 semanas hasta + 8 semanas en relación al parto. Se registrarán los eventos sanitarios en todo este período, condición corporal (al momento del sangrado), producción láctea (hasta final de lactancia) y se tomarán muestras sanguíneas una vez por semana en el predio estabulado y una muestra preparto y cada 15 días postparto en el pastoril-mixto. La información generada en este proyecto permitirá determinar indicadores a nivel de rodeo para implementar medidas de manejo correctivas y realizar medicina preventiva a nivel de predios lecheros para mejorar la salud de las vacas lecheras.

1) INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Producción lechera en Uruguay

El incremento de la producción láctea en nuestro país ha sido constante en los últimos años, pasando de producir 1.494 millones de litros por año en 2003-2004, a 2.057 millones de litros por año en 2011-2012. En el mismo período, la superficie destinada a la producción se ha reducido de 960.000 a 850.000 ha, siendo la productividad por vaca individual lo que explica la mayor proporción del crecimiento productivo. La producción por vaca en ordeño por año creció de 3.830 a 4.358 litros (DIEA, 2012), reflejando un mejor manejo y nutrición de la vaca lechera. Históricamente el sistema productivo Uruguayo ha tenido una base pastoril, no obstante, la estrategia de intensificación de la producción lechera en Uruguay se basó en un incremento significativo del uso de concentrados y reservas forrajeras, disminuyendo la cosecha directa de forraje por parte de los animales (Chilibroste et al., 2012), lo que permitió el salto productivo visualizado en la última década (DIEA, 2011).

Aspectos limitantes de la vaca lechera de alta producción

La intensificación de la producción exige al inicio de la lactancia, un correcto balance nutricional, ya que aumentan los requerimientos para la síntesis de calostro y eventos asociados al parto (Drackley, 1999; Ingvarlsen y Andersen, 2000) al tiempo que ocurre una depresión del consumo voluntario periparto (Grummer, 1995). Dicha depresión del consumo durante el período de transición (pasaje del estado “preñada no lactante” al “no preñado lactante”) implica cambios dramáticos para la vaca, induciendo un estado de balance energético negativo (BEN), considerado éste un mecanismo adaptativo para enfrentar la exigencia metabólica. El aumento de la gluconeogénesis hepática, la menor utilización de glucosa por parte de los tejidos periféricos (resistencia a la insulina), el desacople del eje somatotrófico: hormona de crecimiento (GH), factor de crecimiento similar a insulina (IGF-I) y lipomovilización, con aumento de ácidos grasos no esterificados (AGNE), son adaptaciones homeoréticas, para aumentar la disponibilidad de sustratos energéticos (Bell, 1995; Drackley, 1999).

Si bien todos estos cambios adaptativos son normales en la vaca lechera actual, también aumentan la susceptibilidad a desarrollar enfermedades durante el período de transición. En este período el sistema inmune del animal juega un rol clave activando mecanismos locales y sistémicos de defensa, que inducen inflamación. Dicha respuesta inflamatoria junto a una respuesta inmune desregulada, han sido propuestas como el “eslabón perdido” en la fisiopatología de los disturbios metabólicos de la vaca en transición. Por lo tanto, la interrelación entre el sistema endócrino-metabólico e inmune de la vaca lechera de alta producción actual, induce un sistema inmune deprimido alrededor del parto y mayor susceptibilidad a enfermedades metabólicas e infecciosas (Esposito et al., 2014).

En este sentido se reporta mayor vulnerabilidad a enfermedades metabólicas-nutricionales ya que los mecanismos homeoréticos pueden no ser suficientes para optimizar las funciones que demanda la producción (Ingvarlsen, 2006). Además mayor riesgo de enfermedades inflamatorias, que aumentan el estrés metabólico y comprometen la defensa inmunitaria (Trevisi et al., 2011) y mayores problemas reproductivos (Bertoni et al., 2009; Esposito et al., 2014), disminución de las tasas de preñez y aumento de las tasas de descarte (Smith et al., 2000; Butler et al., 2003). Van Radan et al., (2011) argumenta que dicho declive reproductivo se ha frenado en los últimos años, luego de la incorporación de índices reproductivos en los sistemas de selección genética. No obstante, el estatus reproductivo sigue siendo una de las causas más importantes de las altas tasas de descarte involuntario (Gröhn et al., 2003) y en nuestro país, un estudio basado en 200 mil lactancias indicó que el intervalo parto concepción aumentó de 131 a 150 días de 1997-2001 a 2001-2005 (Rovere et al., 2007).

Impacto de las enfermedades periparto en la rentabilidad de las empresas lecheras

Reducir costos de producción, mantiene la rentabilidad de las explotaciones lecheras. En la última década, en Europa y América del Norte, se ha puesto gran énfasis en la gestión de salud de las empresas lecheras, para minimizar las pérdidas relacionadas a los trastornos de salud (Beaudeau et al., 2000). Dichos trastornos pueden impactar negativamente en el ingreso y rentabilidad de la empresa, ya que disminuyen la eficiencia de producción a través de la disminución de producción láctea y performance reproductiva y acortamiento de la vida útil de la vaca (Gröhn et al., 2003). En este sentido se reporta gran impacto de las enfermedades metabólicas e infecciosas en la toma de decisión de descartar vacas (Beaudeau et al., 2000). En Canadá, aproximadamente el 27 % de descarte de vacas lecheras fue por problemas de salud como la mastitis, cojera u otras enfermedades (CDIC 2011).

Se ha reportado que las enfermedades afectan negativamente la producción láctea durante el proceso de enfermedad, continuando luego de la remisión su impacto negativo durante toda la lactación (Wallace et al., 1996; Fourichon et al., 1999; Gröhn et al., 2003). Se demostró impacto negativo de la cetosis sobre la producción, reportándose pérdidas de 1,1 kg/día en el primer mes de lactancia (Carson, 2008) o retrasos en el reinicio de la actividad ovárica postparto y menor probabilidad de preñez a la primera inseminación asociado a cetosis subclínica (Walsh et al., 2007). Huzzey et al., (2007) reporta 8 kg menos de leche por día durante las 3 primeras semanas de lactación en vacas con metritis severa después del parto y una disminución láctea de 2,6 kg/día en los primeros controles lecheros en vacas multíparas con retención de placenta. Similares pérdidas reporta Dubuc et al., (2011), debido a metritis y retención de placenta (259 kg y 753 kg en 305 días en leche, respectivamente).

A pesar de la constatación del impacto negativo de los trastornos de salud sobre diferentes aspectos, como los mencionados anteriormente, no hemos encontrado estudios, que evalúen con un enfoque integral y completo las pérdidas de vacas multíparas y primíparas cursando con diversos eventos clínicos y subclínicos en el periparto. Además, el sistema productivo en condiciones pastoriles -mixtos es diferente al sistema de estabulación (donde se generó la mayor parte de la información) debido a que existen factores de riesgo inherentes a esos sistemas, lo que hace necesario generar información en estos sistemas, para entender y caracterizar la respuesta “de salud” de las vacas lecheras en dichos sistemas de producción..

Avances en el conocimiento de la etiopatogenia de las principales enfermedades del periparto y su relación con el BEN

El progreso genético a favor de la producción de leche está asociado a las hormonas que regulan el metabolismo. Se ha demostrado que vacas de alto mérito genético presentan mayores concentraciones de GH y menores de insulina e IGF-I que vacas de bajo mérito genético (Gong et al., 2002). Las hormonas anabólicas, insulina e IGF-I se encuentran disminuidas alrededor del parto para favorecer el catabolismo periférico y soportar la lactancia (Meikle et al., 2013). En Uruguay se ha reportado pérdida de peso y condición corporal en vacas durante el período seco cursando con altas concentraciones de AGNE y beta-hidroxibutirato (BHB), como resultado del aumento en la cetogénesis (Meikle et al., 2004; Cavestany et al., 2005).

Se ha demostrado que, la secreción de insulina alterada, resistencia a insulina (RI) en los tejidos periféricos, e hipercetonemia en vacas durante el periparto, se asocian a la presentación de metritis puerperal y retraso de la actividad ovárica posparto (Kerestes et al., 2009) y diversos grados de lipidosis hepática, junto con otros problemas como metritis, mastitis y laminitis.

Un BEN severo se ha relacionado con la aparición de cetosis (Ingvarstsen et al., 2006) e hígado graso (Bauchart et al., 1998) siendo, la medición de AGNE, BHB y colesterol, útil para evaluar la capacidad adaptativa de la vaca, reflejando el éxito o no de dicha adaptación (Herdt, 2000). El hígado graso clínico o subclínico induce disfunción hepática (Turk et al., 2004) pudiendo llegar a ser éste, un problema para más del 50% de las vacas al inicio de la lactancia (Jorritsma et al., 2001).

Además se observó, que la liberación de citocinas proinflamatorias en vacas lecheras con

enfermedades puerperales inflamatorias severas como la metritis impactan a largo plazo en el metabolismo y la reproducción, asociado a una depresión de la secreción de insulina (en las células β -pancreáticas) y menor respuesta tisular a dicha hormona (Kerestes et al., 2009). En otro estudio, se observó que la liberación de citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (TNF- α), ocurre principalmente en el período de transición junto a distintos procesos inflamatorios, afectando la homeostasis de la glucosa y el metabolismo de los lípidos (Oikawa y Oetzel, 2006). Es así que vacas lecheras con lipidosis hepática severa presentaron mayor actividad sanguínea de TNF- α y menor captación de glucosa que vacas con lipidosis hepática leve (Ohtsuka et al., 2001).

Por otro lado, varios componentes del sistema de defensa (funciones de los neutrófilos, capacidad de respuesta linfocitaria a la estimulación por mitógenos entre otros) están alterados durante el período de transición, (Lacetera et al., 2005; Goff, 2006) y se postula sea, una de las principales causas de la alta prevalencia de enfermedades como metritis o mastitis, durante el posparto temprano (Kimura et al., 2002). Por lo tanto, la inmunosupresión junto a marcados cambios en el estatus endocrino, metabólico y nutricional, estarían favoreciendo el desarrollo de la infección en la vaca después del parto (Burton et al., 2005; Goff, 2006; Spears y Weiss, 2008).

Rol del tejido adiposo en la presentación de las enfermedades del periparto

La lipomovilización excesiva es un factor de riesgo para la presentación de las enfermedades del periparto, tanto clínicas como subclínicas, ya que los adipocitos además de almacenar o movilizar los triglicéridos, sintetizan y liberan una amplia variedad de moléculas bioactivas conocidas como adipocinas. Éstas permiten la comunicación del tejido adiposo con otros órganos del cuerpo (hígado, músculos, cerebro, órganos reproductores), así como dentro del tejido adiposo (Mitchell et al., 2005; Bartness et al., 2005; Moschen et al., 2012). Se propone que, las disfunciones metabólicas pueden deberse en parte a un desequilibrio en la expresión de adipoquinas pro- inflamatorias (interleuquinas (IL-6, IL-1), TNF- α) y adipocinas anti-inflamatorias (adiponectina), siendo el equilibrio adecuado entre ellas crucial para mantener la homeostasis en el cuerpo (Ouchi et al., 2011).

La adiponectina, secretada principalmente por el tejido adiposo, y que también se expresa en células del musculo cardíaco y esquelético (Jortay et al., 2012), posee importantes funciones metabólicas, incluyendo la mejora de la sensibilidad de la insulina, estimulación del apetito y la promoción de la beta - oxidación de ácidos grasos en hígado y músculo (Kadowaki et al., 2005). En contraste con la mejora de la sensibilidad a insulina en el tejido adiposo y el músculo, la adiponectina inhibe la señalización de la insulina en la placenta, pero se desconocen los mecanismos moleculares implicados (Aye et al., 2014). Bajas concentraciones de adiponectina en el periparto de la vaca lechera, podrían predisponer a una respuesta inflamatoria monocítica descontrolada. Este hecho podría estar relacionado con los potentes efectos anti-inflamatorios de las adipocinas en los macrófagos y otras células inmunes (Kabara et al., 2013). Se postula que los niveles de adiponectina materna inhiben la señalización de insulina placentaria y el transporte de aminoácidos, determinando menor disponibilidad de nutrientes fetales (Aye et al., 2014), hecho que podría estar relacionado con una mayor susceptibilidad a la retención placentaria en vacas lecheras.

Por otro lado, las citoquinas TNF- α , IL-6 y IL-1, tienen diversas funciones en el sistema inmune y en la mediación de la inflamación, así como en la regulación de funciones fisiológicas. Promueven una respuesta local y sistémica para contribuir con el sistema de defensa del organismo, determinan cambios metabólicos y endocrinos, inducen anorexia, fiebre y lipólisis (Elsasser et al., 1995). Por lo tanto, sus efectos pueden aumentar el riesgo de presentación de enfermedades metabólicas e inflamatorias desempeñando un papel en la etiopatogenia de las enfermedades como mastitis, choque endotóxico, acidosis y cetosis (Goff y Horst, 1997). Además el TNF- α y las IL-1 y IL-6, estimulan la síntesis hepática de proteínas de fase aguda positiva (pAPP) como la haptoglobina y ceruloplasmina (Chan et al., 2004; Huzzey et al., 2009).

Enfermedades periparto: factores de riesgo y diagnóstico paraclínico

Si bien no se conocen todos los factores de riesgo para la presentación de las enfermedades del periparto, se sabe que las enfermedades frecuentemente están interrelacionadas. En este sentido, la cetosis se relaciona con la hipocalcemia, así como con la retención de placenta (Mulligan y Doherty, 2008). Se postula que la mayor producción, está relacionada con la incidencia de mastitis, quistes ováricos o mayor riesgo a cetosis (Igvartsen et al., 2003). Sin embargo, el mismo grupo reporta en trabajos posteriores, que las vacas de mayor producción no presentan mayor riesgo de enfermedades periparto, como ser hipocalcemia clínica, cetosis, metritis y retención de placenta, lo que sugiere que la patogénesis no está directamente relacionada con la producción de leche *per se*, sino con otras variables (Igvartsen et al., 2006). De todos modos, las enfermedades metabólicas e inflamatorias son una manifestación de la incapacidad de la vaca para hacer frente a las demandas metabólicas de la producción de leche (Mulligan y Doherty, 2008).

Algunos investigadores han establecido en sistemas productivos estabulados, con ración totalmente mezclada (TMR), el “punto de corte” de algunas variables sanguíneas en vacas lecheras, para predecir riesgo de enfermedad durante el período de transición (Van Saun, 2009). Concentraciones de AGNE $> 0,4$ mmol/L de 7 a 10 días preparto, han sido asociadas con aumento de riesgo en 2-4 veces de presentación de desplazamiento de abomaso (Le Blanc et al., 2005) y en 2 veces aumento de riesgo de retención placentaria (Quiroz-Rocha et al., 2009). En Chile, se observó que vacas con concentración de AGNE al parto de 1,2 mmol/L, presentaron mayor incidencia de mastitis clínica y de fiebre de leche que vacas con valores $< 1,2$ mmol/L (Meléndez et al., 2009). Para confirmar la cetosis (consecuencia del severo BEN), la prueba de oro, es la determinación de BHB en sangre, ya que en ausencia de oxalacetato, la producción de BHB es mayor a su utilización, siendo la causa de su aumento en sangre. Se ha establecido un límite de 1,2 mmol/L para el diagnóstico de cetosis subclínica y de 2,6 mmol/L para el de cetosis clínica (Oetzel, 2004). Se ha reportado, que concentraciones $> 1,2$ mmol/L aumentan el riesgo en 3-8 veces de presentación de desplazamiento de abomaso (Duffield et al., 2005) y 3 a 6 veces el riesgo de metritis, endometritis, cetosis clínica y mastitis (Duffield et al., 2009). También se ha demostrado la asociación de la cetosis con la disminución de la performance reproductiva, reportando que vacas con BHB en leche $> 1,0$ mmol/L en la primera semana postparto tienen 1,5 veces más probabilidad de no tener ovulación incluso por 9 semanas postparto y menor probabilidad de preñez a la primera inseminación (Walsh et al., 2007). Estudios recientes han indicado que el colesterol es un predictor del riesgo de presentación de enfermedades periparto en las vacas, reportando Sepulveda et al., (2015) que vacas con metritis leve y severa presentaron menores concentraciones de colesterol que vacas sanas, durante la 2° y 3° semana postparto.

En cuanto al balance mineral, se ha definido hipocalcemia subclínica a las concentraciones sanguíneas de Ca $< 2,0$ mmol/L (Oetzel 2004). Dicha afección se reporta en vacas lecheras, principalmente multíparas (Sepulveda et al., 2010) y además que se asocia con mayor riesgo de presentación de mastitis, desplazamiento de abomaso, retención placentaria y cetosis (Curtis et al., 1985, Van Saun et al., 2005). El calcio también afecta la función de los neutrófilos que participan en la primera línea de defensa contra la infección, conduciendo a un estado de inmunosupresión (Kehrli et al 2006). Al respecto se sabe que vacas con metritis puerperal exhiben marcada disminución en la capacidad fagocítica de los neutrófilos (Hammon et al., 2006).

El estatus inflamatorio sistémico asociado a las enfermedades periparto, puede ser monitoreado por marcadores inflamatorios; proteínas de fase aguda positivas (pPFA) y negativas (nPFA). Se ha señalado a la haptoglobina (pPFA) como buen marcador, para la detección de animales enfermos debido a su buena y rápida respuesta en la fase aguda de enfermedad (Eckersall, 2000). Al respecto, se reportan aumentos de haptoglobina, en situaciones de BEN severo con lipidosis hepática o en procesos inflamatorios o traumas, ya que las células del parénquima hepático, responden al estímulo nocivo aumentando su síntesis (Katho, 2002). A su vez, puede ser indicativa de riesgo de enfermedad; Huzzey et al., (2009) reporta que vacas con concentraciones de haptoglobina ≥ 1 g/L en el día 3 posparto

presentaron 6,7 veces más riesgo de desarrollar metritis severa o leve, indicando que una respuesta inflamatoria de fase aguda precede a los eventos clínicos.

Otro buen marcador inflamatorio propuesto es, la paraoxonasa (PON), una nPFA. PON, es una proteína hepática con actividad hidrolasa que se libera en el torrente sanguíneo y puede servir como índice de medición de funcionalidad hepática ya que disminuye drásticamente frente a daño hepático crónico (James y Deakin, 2004). Estudios de PON en hígado bovino son escasos, pero se ha reportado menor actividad de PON en vacas enfermas (Bionaz et al, 2007). Esto puede deberse a la movilización lipídica y acumulo de triglicéridos en hepatocitos, causando daño hepático y disfunción, reducción de colesterol y lipoproteínas de alta densidad (HDL) o estrés oxidativo o una combinación de éstos (Turk et al., 2004, 2005). Sumado a lo antedicho, la relación positiva reportada entre PON y producción de leche señala la importancia de prevenir la inflamación durante el período de transición (Bionaz et al, 2007).

Se estima que en sistemas intensivos de producción, bajo estabulación, cerca del 75 % de todas las enfermedades se producen dentro del primer mes posparto (Grummer, 1995; Goff y Horst, 1997; Ingvarlsen et al., 2003; Ingvarlsen, 2006), ya que el 30 a 50 % de las vacas son afectadas por algún tipo de enfermedad metabólica o infecciosa durante este período (Le Blanc, 2010). Factores de riesgo como el estado corporal o la paridad son importantes. Una excesiva condición corporal o variaciones de balance energético preparto predisponen a cetosis y lipidosis hepática (Ingvarlsen et al., 2006) y la paridad tiene efecto diferencial en la incidencia de enfermedades siendo las vacas primíparas más susceptibles a metritis que las múltiparas (Galvão et al., 2012) o las múltiparas más susceptibles a hipocalcemia (Reinhardt et al., 2011). Hemos demostrado que el bajo estado corporal al parto o un mes antes del parto tiene efectos negativos sobre la producción de leche y sobre la longitud de anestro posparto lo que demuestra el grado de estrés metabólico que sufren estos animales (Meikle et al., 2004; Adrien et al., 2012). Varios autores documentan menor incidencia de trastornos de la salud en los sistemas de producción a pastoreo (Bendixen et al., 1986; Washburn et al 2002; White et al., 2002; Bruun et al., 2002, Ribeiro et al., 2011). Sin embargo, Sepúlveda et al., (2015) reportan que la incidencia de patologías clínicas y subclínicas puede ser alta en sistemas pastoriles, encontrando valores similares a los reportados en sistemas de estabulación. Igualmente, se puede afirmar que tanto en sistemas extensivos como intensivos, dichos trastornos de salud, llevan a pérdidas económicas importantes para los productores, siendo uno de los problemas de bienestar más importantes afectando a las vacas lecheras (von Keyserlingk et al., 2009).

Por lo tanto, la determinación de las variables sanguíneas anteriormente mencionadas, pueden ser una herramienta promisoría para el monitoreo de salud del rodeo e identificación precoz de enfermedades, colaborando con la medicina preventiva de la vaca lechera en transición y la optimización de una buena gestión de salud en las empresas lecheras.

2) CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA

Las vacas lecheras en el periparto son más susceptibles de presentar enfermedades metabólicas-nutricionales así como enfermedades inflamatorias, estando dichas enfermedades asociadas a marcadas alteraciones en el metabolismo energético y hormonal durante el período de transición. La tasa de movilización lipídica y la actividad del tejido adiposo son responsables de los trastornos que afectan negativamente la función inmune y hepática (Rosen y Spiegelman, 2006; Deng y Scherer, 2010). Actualmente se han determinado muchos indicadores metabólicos, minerales o de inflamación como ser AGNE, BHB, colesterol, Ca y haptoglobina entre otros, para el diagnóstico de las diferentes enfermedades metabólicas e infecciosas del período de transición, pero en general los trabajos presentan indicadores parciales lo que dificulta la comprensión holística de la problemática.

Se desconocen puntos de corte y valores predictivos de enfermedad para algunas de las variables sanguíneas mencionadas anteriormente o como se relacionan dichas variables con el estado corporal o paridad de las vacas en sistemas de producción pastoriles-mixtos. Tampoco se ha investigado que efecto tienen las enfermedades del periparto sobre las variables productivas, reproductivas o sobre la toma de decisión de descartar vacas en sistemas pastoriles- mixtos. La información generada sobre puntos de corte o en relación a la liberación de citoquinas del tejido adiposo y el riesgo de presentación de enfermedades, se concentra en sistemas de estabulación y el confinamiento de por sí genera situaciones de riesgo a enfermedades, diferentes a las que pueden ocurrir en sistemas pastoriles-mixtos como los existentes en Uruguay. En trabajos realizados en nuestro país se ha demostrado el impacto de la paridad y el estado corporal del periparto sobre parámetros productivos y reproductivos, basados en la evaluación de metabolitos y hormonas (Meikle et al., 2004, Adrien et al., 2012, Meikle et al., 2013), caracterizando el metabolismo y el ambiente endócrino de vacas lecheras en sistemas pastoriles. Se ha estudiado el efecto del balance energético, la paridad y el estado corporal al parto sobre parámetros productivos y reproductivos en vacas manejadas en diferentes sistemas de alimentación con base pastoril. Sin embargo poco se conoce sobre el efecto del bajo estado corporal preparto o la paridad sobre la susceptibilidad de presentar enfermedades en el periparto o como éstas afectan, la producción, reproducción o tasa de descarte de vacas.

Esta propuesta apunta a iniciar una línea de investigación en el conocimiento de las enfermedades del periparto en los rodeos bovinos, sus asociaciones con factores de riesgo e indicadores sanguíneos para diagnóstico y monitoreo de los rebaños, así como el impacto de las enfermedades sobre la producción y la reproducción. La finalidad de este proyecto es generar conocimiento original en salud en sistemas productivos pastoriles-mixtos (pastoreo con reservas y concentrados), que contribuyan a instaurar una estrategia de medicina preventiva adaptada a éstas condiciones de producción lechera.

3) HIPOTESIS

Hipótesis 1. El sistema de alimentación (Pastoril-mixto vs Estabulación) modifica las concentraciones sanguíneas de los metabolitos, hormonas, adipocinas y marcadores inflamatorios.

Hipotesis 2. La incidencia de enfermedades es superior en multíparas y en vacas con mayores cambios de condición corporal durante el período de transición.

Hipotesis 3. Colesterol, Ca y albúmina son mejores predictores de riesgo de enfermedades que BHB y NEFA en vacas lecheras en período de transición.

Hipotesis 4. Haptoglobina y Paraoxonasa son marcadores inflamatorios precoces y de diagnóstico para predecir riesgo de enfermedades.

Hipótesis 5. Vacas multíparas y primíparas cursando enfermedades periparto clínicas o subclínicas, reducen la producción de leche, presentan índices reproductivos sub óptimos y aumentan las tasas de descarte involuntario.

4) OBJETIVOS

General:

Contribuir al conocimiento en Salud de rodeos lecheros en diferentes sistemas de manejo.

Específicos:

Objetivo 1. Caracterizar las variaciones de las concentraciones de marcadores metabólicos e

inflamatorios en vacas sometidas a 2 sistemas de alimentación contrastante (Pastoril-Mixto y Estabulación).

Objetivo 2. Evaluar si los cambios de condición corporal durante el período de transición afectan la presentación de enfermedades en multíparas y primíparas.

Objetivo 3. Determinar y comparar el valor predictivo de marcadores metabólicos para establecer el riesgo de enfermedades durante el período de transición.

Objetivo 4. Determinar y comparar el valor predictivo de marcadores inflamatorios para el diagnóstico precoz de enfermedades durante el período de transición.

Objetivo 5. Evaluar las tasas productivas y reproductivas de vacas primíparas y multíparas cursando con enfermedades durante el período de transición.

5. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

El proyecto pretende desarrollarse en dos etapas: la primera etapa se realizará en condiciones de experimentación para poder comparar diferentes sistemas de producción y caracterizar en la vaca lechera la concentración de las variables sanguíneas en dos sistemas. Dichos sistemas de alimentación serán uno Pastoril-mixto (pastoreo + dieta parcialmente mezclada (DPM) y el otro Estabulado (100% concentrado y ensilaje (TMR), sin pastoreo). Se realizará un seguimiento preciso del estatus metabólico, hormonal y productivo de los animales lo que permitirá evaluar el efecto del manejo de los dos sistemas de producción.

La segunda etapa se realizará en predios comerciales, debido a que una de las principales limitantes para estudiar el valor predictivo y utilidad diagnóstica de las variables a ser utilizadas en relación a la presentación de enfermedades, es el número acotado de animales en las estaciones experimentales, lo que impide realizar este tipo de investigación en dichas instituciones. Por lo tanto, para lograr un número significativo de animales, el estudio se desarrollará en 2 predios comerciales contando en promedio con 700 vacas en ordeño en el Tambo 1 y con 1000 vacas en ordeño en Tambo 2, incluyendo vacas primíparas y multíparas en ambos predios.

Primera etapa:

Se utilizarán 42 vacas de raza Holando multíparas de parto de primavera (agosto-setiembre), bloqueadas por fecha de parto, peso vivo (PV), condición corporal (CC), producción previa y número de lactancias. El experimento tendrá un diseño de bloques completos al azar con dos tratamientos (n=21 por tratamiento): T1: Pastoreo-mixto (pastoreo + dieta parcialmente mezclada (DPM)) durante los 270 días posparto y T2: Estabulado (dieta totalmente mezclada (DTM)). En ambos tratamientos las vacas serán ordeñadas dos veces por día durante toda la lactancia.

Para cumplir con el objetivo 1, se monitorearán los animales quincenalmente desde -30 días preparto hasta 270 días post parto e incluirá registro de la CC (acorde los criterios definidos más adelante en materiales y métodos). Además se obtendrán muestras de sangre para la determinación de adipocinas (TNF, IL-1, IL-6, adiponectina), hormonas (IGF-I, insulina, progesterona), metabolitos (BHB, AGNE, colesterol, calcio) y marcadores inflamatorios (haptoglobina, paraoxanase).

Segunda etapa:

Tambo 1, se monitorearán 300 vacas primíparas y multíparas, provenientes de 1 predio comercial con 700 vacas en ordeño y Tambo 2, se monitorearán 300 vacas primíparas y multíparas, provenientes de

un predio comercial con 1000 vacas.

En ambos predios se clasificarán los animales retrospectivamente en 3 categorías acorde a su estatus de salud entre los 15 días previos al parto, hasta los 60 dpp:

- a) "sin eventos", vacas que no presenten diagnóstico de la enfermedad clínica o subclínica.
- b) "un evento", vacas que sólo han sido diagnosticadas con 1 evento de enfermedad.
- c) "múltiples eventos" vacas con más de 1 enfermedad diagnosticada.

Para cumplir con los objetivos 2, 3 y 4, se monitorearán las vacas desde -2 semanas preparto hasta a +8 semanas en relación al parto e incluirá: registro de la condición corporal (CC) y examen clínico en busca de las diferentes patologías clínicas (mastitis clínica, retención de placenta, metritis, cetosis e hipocalcemia puerperal) acorde a los criterios definidos más adelante en punto 6, materiales y métodos). Además se obtendrá muestras de sangre para la determinación de adipocinas (TNF, IL-1, IL-6, adiponectina), hormonas (IGF-I, insulina, progesterona (P4)), metabolitos (BHB, AGNE, colesterol, calcio) y marcadores inflamatorios (haptoglobina, paraoxanase). Para poder cuantificar el impacto de las enfermedades del periparto sobre la producción de leche, y reinicio de actividad ovárica (objetivo 5), se registrará producción de leche individual a 305 días en Tambo 1 y 2, y se determinará reinicio de actividad ovárica postparto por medio de P4 sanguínea en tambo 1.

6) MATERIALES Y MÉTODOS

Primera etapa:

Este estudio será realizado en un predio experimental, utilizando 42 vacas Holando multíparas, con partos concentrados en primavera sometidas a dos tratamientos nutricionales (Pastoreo-mixto vs Estabulación-TMR), contando con 21 vacas por tratamiento.

Diseño Experimental: Previo al parto, las vacas preñadas serán manejadas en forma conjunta de manera de cubrir los requerimientos de mantenimiento y gestación, manteniendo la CC en 3,5 (escala de 1-5) durante el período seco. Se registrará la CC quincenalmente (Ferguson et al., 1994) desde los -30 a los 270 DPP y se obtendrán muestras de sangre mediante punción de la vena coccígea usando tubos con heparina (centrifugado 2000 Xg, 15 min a 4°C) para la determinación de la concentración de metabolitos, hormonas y marcadores inflamatorios a los -28, -14, -7, 7, 14, 28, 42, 56, 84, 98, 112, 168, 182, 270 DPP.

Manejo y dieta: Las vacas preñadas durante el período seco lejano (60 a 20 días preparto), se alimentarán en base a pastoreo y suplementación en caso de ser necesario y durante el período seco próximo al parto (20 días preparto al parto), la dieta se formulará en base a ensilaje de maíz, heno de moha y concentrados. Además, en el preparto (30 días más o menos) se administrará a las vacas un Fasciolicida, (Nitroxinil®) 15 mg/kg, vía S/C, y se vacunarán contra Leptospirosis y Clostridiosis (Ultravac®).

El pastoreo durante el postparto,(T1)se realizará sobre una pastura de segundo año mezcla de gramíneas y leguminosas, en dos sesiones diarias de acceso a la pastura (7 h am + 4 h pm) con una oferta de forraje de pastura (por encima de 4 cm del suelo) lo que cubrirá el 50% o más de los requerimientos de energía neta de lactación (ENL; NRC, 2001). La dieta parcialmente mezclada (DPM) se formulará para complementar el aporte de nutrientes y energía de la pastura utilizando ensilaje de maíz y mezcla de alimentos concentrados y se ofrecerá a los animales luego del ordeño de la tarde. En

T2, postparto, la dieta totalmente mezclada (TMR) se formulará para cubrir los requerimientos de nutrientes, mantenimiento y lactación (40 kg de leche al pico de producción) con una relación forraje:concentrado de 40:60 a 70:30 de acuerdo al momento de la lactancia y se ofrecerá en dos momentos luego de cada ordeño. Las dietas DPM y TMR se ofertarán en tres corrales por tratamiento y la cantidad ofertada de las mismas se ajustará semanalmente para permitir un 10 a 15% de rechazo.

Producción láctea: Las vacas serán ordeñadas dos veces por día, en una sala con un sistema espina de pescado. La producción de leche individual se registrará diariamente, hasta el final de la lactancia. Además se coleccionarán muestras de leche (durante los dos ordeños) para la determinación de proteína, grasa, lactosa y urea (Milkoscan® Foss FT2) semanalmente desde el parto hasta los 90 DPP, quincenalmente desde los 91 hasta los 180 DPP y mensualmente desde los 181 hasta los 270 DPP.

Medición de consumo: Durante el período seco, (25 días preparto) y en lactancia temprana (15 días posparto), se registrará el consumo de MS total individual mediante la medición de lo ofrecido y rechazado y mediante la técnica de doble marcador (óxido de cromo y FDN indigestible; 8 días de dosificación am y pm + 4 días de colección heces; Hoffer et al., 1985). Se tomarán muestras de la dieta ofrecida y rechazada para el análisis de composición química. También se estimará la composición química del forraje consumido recolectando muestras de “handclipping” (Coates y Penning, 2000).

Retorno a ciclicidad ovárica: Se determinará el reinicio de la ciclicidad ovárica en todos los animales. Para ello se determinará la concentración plasmática de progesterona. Los animales tendrán un tiempo de espera voluntario de 60 días, realizando el manejo tradicional se inseminará con el mismo semen de calidad probada a todos los animales. Teniendo en cuenta el número limitado de animales por grupo (n=21), se registrarán todos los eventos reproductivos que se informarán de forma descriptiva (intervalo parto primer servicio, intervalo parto-concepción, intervalo reinicio de la ciclicidad-primer servicio e intervalo reinicio de la ciclicidad-concepción).

Procesamiento y análisis de las muestras sanguíneas:

Las muestras de sangre serán obtenidas por venopunción coccígea con tubos heparinizados para obtención de plasma. Los tubos serán centrifugados por 10 minutos a 1.000 x g y el plasma será congelado a -20 °C hasta su análisis, en el laboratorio de técnicas nucleares de Facultad de Veterinaria. Se analizarán las concentraciones plasmáticas de AGNE (AGNE, WAKO, NEFA-C, WAKO Pure Chemical Industries, Osaka, Japan), BHB (Randox, D-3-Hydroxybutyrate, Ranbut), colesterol (Wiener, Colestat enzimático AA liq) y calcio (Ca-color Arsenazo III, Wiener), mediante espectrofotometría con un analizador automatizado (Vitalab Selectra II).

Haptoglobina, será determinada por ELISA utilizando un kit comercial, (Tridelta Diagnostics Ltd., Morris Plains, NJ), técnica disponible en el laboratorio y Adiponectina, será determinada por RIA utilizando un Kit comercial en fase líquida (Millipore, LA, USA) previamente descrito por Raddatz et al. (2008). Paraoxonasa, será determinada utilizando el método de hidrólisis de paraxon (O,O-diethyl-O-pnitrophenylphosphate, Sigma Chemical Co., London, UK) como descrito por Turk et al. (2004). IL-6, se realizará mediante un ELISA sándwich utilizando anticuerpos bovinos específicos para la IL-6 de acuerdo a la técnica descrita por Hagiwara et al. (2001) e IL-1 y TNF: serán determinados por ELISA, (anticuerpos primarios y secundarios de Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, CA, USA), según descrito por Kasimanickam et al. (2013).

Insulina, será determinada usando un kit de ensayo inmunoradiométrico, comercial (Diasource Immuno Assays S.A, Nivelles, Belgica) e IGF-I será determinado mediante un kit inmunoradiométrico, comercial (IGF1-RIACT Cis Bio International, GIF-SUR-YVETTE CEDEX, France). P4 será medida por RIA en fase sólida, kit comercial (Diasource Immuno Assays S.A, Nivelles, Belgica).

Análisis estadístico:

Las concentraciones de metabolitos, hormonas, marcadores inflamatorios, la producción y composición de la leche serán analizadas mediante el ajuste de modelos lineales generales de medidas repetidas en el tiempo. Se utilizará el procedimiento MIXED (SAS) incluyendo en el modelo el sistema de

alimentación como efecto fijo y el bloque como efecto aleatorio.

La CC se analizará ajustando modelos lineales generalizados asumiendo una distribución multinomial ordinal.

Segunda etapa: Se realizará en 2 predios comerciales, Tambo 1 y Tambo 2.

Tambo 1

Este estudio será realizado en un predio comercial con 700 vacas en ordeño con partos concentrados en otoño y con un sistema alimentación estabulado con dietas totalmente mezcladas (TMR).

Diseño experimental: Serán evaluadas 300 vacas Holando, primíparas y multíparas semanalmente para la determinación de la CC (Ferguson et al., 1994) y se obtendrán muestras de sangre desde 2 semanas preparto hasta la 8^a semana de lactación. Se registrarán también, todos los eventos de salud durante el período de estudio y producción láctea individual hasta el final de la lactancia.

Manejo y dieta: Las vacas en el período seco (60 días preparto) serán vacunadas para *Escherichia coli* (J-vac®, Merial) y para *Rotavirus bovino*, *Coronavirus bovino* y *E. coli* (Bovilis Triguard®, MSD). Aquellas entre -28 a -21 días preparto serán alojadas en un potrero preparto, donde permanecerán hasta el parto, con baja oferta de pradera (< 10 kg MS/vaca día) y recibiendo una vez al día TMR (ensilaje de maíz, ensilaje de avena, harina de soya, maíz molido, pulpa cítrica) con sales aniónicas, acorde con los requerimientos. Además al ingresar en el grupo de transición preparto las vacas serán revacunadas para *Escherichia coli* (J-vac®, Merial) y para *Rotavirus bovino*, *Coronavirus bovino* e *E. coli* (Bovilis Triguard®, MSD). Los animales serán observados 3 veces al día para monitoreo del parto.

Del día del parto hasta el día 3 del posparto las vacas serán alojadas en un *Compost barn*, y alimentadas con TMR (ensilaje de maíz, ensilaje de avena, harina de soya, maíz molido, pulpa cítrica), ordeñadas dos veces al día, y sometidas a examen clínico diario.

Del día 3 al 21 posparto las vacas serán manejadas en el *free stall* de período de transición posparto con camas individuales de alta densidad, y con dieta TMR (ensilaje de maíz, ensilaje de avena, harina de soya, maíz molido, pulpa cítrica). Posterior al día 21 las vacas serán manejadas en un free stall de vacas de alta producción con camas individuales y con dieta TMR (ensilaje de maíz, ensilaje de avena, harina de soya, maíz molido, pulpa cítrica), acorde a los requerimientos. Las vacas en período de transición (+4 hasta +21 días) y las con +22 días serán ordeñadas 3 veces por día en sistema de carrusel (DeLaval), ocasión donde los animales serán monitoreados para observar bajas en la producción y presentación de enfermedades.

Producción láctea: A partir del posparto se registrará la producción láctea individual diaria de cada vaca hasta el final de la lactación con un Software Alpro windows, (Daiy Plan y Unifor agri) conectado a la sala de ordeño en carrusel (De Laval), para determinar la curva de producción y producción hasta los 305 días de lactación.

Retorno a ciclicidad ovárica: El reinicio de la ciclicidad será determinado mediante análisis de las concentraciones de P4 plasmáticas, en muestras sanguíneas obtenidas desde la 3^a hasta la 8^{va} semana posparto, 1 vez por semana. Se definirá actividad luteal cuando la progesterona sea mayor a 1 ng/mL.

Tasa de Descartes. Los descartes por muertes o problemas de salud serán registrados.

Tambo 2

Este estudio será realizado en un predio comercial con 1000 vacas en ordeño con partos concentrados en otoño, sistema alimentación pastoril-mixto.

Diseño experimental: Serán evaluadas 300 vacas Holando Argentino primíparas y multíparas, a los 8-15 días preparto y luego del parto a los 5-12 días y 28-35 días, para la determinación de la CC (Ferguson et al., 1994) y obtención de muestras de sangre en dichos momentos. Se registrarán también, todos los eventos de salud durante el período de estudio y producción láctea individual hasta el final de la lactancia.

Manejo y dieta: En el período seco (-45/-55 días preparto), las vacas serán vacunadas para *Escherichia coli* (Rotatec J5®, Biogénesis), *Pasteurella multocida* grupo A, *Pasteurella haemolytica*, *Salmonella dublin*, *Haemophilus somnus*, Herpevirus bovino 1 (IBR), Parainfluenza 3 (PI3) (Pleurovac Bovinos Plus®, ibsa); *Salmonella dublin*, *Salmonella typhimurium* (Ibsalert Salmonellas®, ibsa). A los -21/-28 días preparto las vacas pasarán a un corral de preparto, donde se revacunarán (igual que em período seco) y se agregará además Vitaminas A, D3 y E (Vigantol AED®, Bayer) y Ácido 1-(N-butilamino)-1-metietil fosfonoso (Fósforo 15-30®, Burnet). La alimentación será de muy baja oferta de pasto verde (ya que los potreros donde se alojarán estas categorías serán previamente fumigados) y recibirán además hasta el momento del parto silaje de maíz y balanceado preparto, incluyendo sales aniónicas dos veces al día y rolos de paja de trigo.

Los animales serán observados permanentemente durante todo el día. En el postparto, las vacas serán ordeñadas en una maternidad, identificadas y se les aplicará magnesio, calcio, zinc, cobre, cobalto, manganeso (Magnecal plus zinc®, Agroinsumos). Posteriormente ingresarán al tambo juntándose con el rodeo general. La alimentación consistirá en pasturas consociadas de Alfalfa, Cebadilla, Trébol Rojo, Trébol Blanco, Rye Grass perenne y Festuca (las especies ofrecidas dependerán del potrero que las vacas estén pastoreando) y además recibirán ensilaje de maíz, rollos de pradera y balanceado durante el ordeño, dos veces al día.

Producción láctea: Durante el posparto se registrará la producción láctea individual mensual hasta el final de la lactación para determinar la curva de producción y producción hasta final de lactancia. Las vacas se ordeñarán 2 veces al día, en un sistema espina de pescado, con un equipo DeLaval. El control individual de la producción se hará una vez al mes a través de un controlador oficial midiendo la producción de cada vaca durante los 2 ordeños.

A los 30 días postparto, se revisarán las vacas para evaluar la involución uterina por exploración rectal.

Tasa de Descartes. Los descartes por muertes o problemas de salud serán registrados.

Procesamiento y análisis de las muestras sanguíneas:

La determinación de NEFA, BHB, Ca, colesterol, haptoglobina, PON, TNF, IL-1, IL-6, adiponectina, Insulina e IGF-I será realizada utilizando la misma metodología que en la etapa 1.

Diagnóstico de las enfermedades clínicas: Será realizado por un médico veterinario, según los siguientes criterios:

Retención placentaria. El diagnóstico de la retención de placenta será realizado cuando las membranas fetales se encuentren visibles en la vulva 24 horas después del parto.

Metritis: se diagnosticará mediante la presencia de secreción vaginal (SV) durante el postparto temprano. Según el aspecto y olor de la SV serán asignados a las categorías 0 a 4, basadas en el sistema de puntuación utilizado por Urton et al (2005): “0” = ausencia de moco o mucosidad clara; “1”= moco nublados con manchas de pus; “2”= mocopurulenta (≤ 50 % pus presente) y con olor fétido; “3”= purulenta (> 50 % pus presente) y con olor fétido; “4”= pútrido (rojo o de color marrón, acuosa, con mal olor). Además, se determinará la temperatura rectal.

Mastitis clínica: leche visiblemente anormal, con o sin cambios anormales de la glándula mamaria determinado durante el ordeño.

Desplazamiento de abomaso: mediante percusión-auscultación.

Hipocalcemia puerperal: vaca recostada dentro de las 72 horas después del parto exhibiendo anorexia, síntomas nerviosos, diferentes grados de pérdida de consciencia y la buena respuesta al tratamiento con calcio por vía intravenosa (recuperación del estado de postración y síntomas nerviosos).

Diagnóstico de las enfermedades sub clínicas: Serán realizadas en las muestras de sangre mediante determinación en el laboratorio. Se considerará ***Cetosis subclínica:*** BHB $>6=$ a 1,2 mmol/L (Oetzel,

2004) e *Hipocalcemia subclínica*: Ca < de 2,0 mmol/L (Goff, 2008).

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los tambos experimentales se analizará de forma independiente.

Se utilizará el software SAS (versión 9.3; SAS Inst Inc, Cary, NC). Para estudiar el efecto de la paridad y CC sobre la ocurrencia de enfermedades, se realizará una regresión logística con distribución binomial (enfermo/sano) incluyendo en el modelo estadístico los factores previamente mencionados como efectos fijos.

Posteriormente, las vacas serán incluidas retrospectivamente en 3 categorías acorde a su estatus de salud: Vacas "sin eventos", "un evento" y "múltiples eventos". Estas categorías se aplicarán 3 veces, teniendo en cuenta vacas sólo con eventos clínicos, subclínicos o ambos.

Se utilizará una prueba de chi-cuadrado para evaluar la asociación entre las variables categóricas, nº de partos y los resultados de las enfermedades individuales. Los datos serán estratificados por tiempo acorde a la etapa (preparto y posparto).

Las concentraciones de los metabolitos, hormonas, adipoquinas y marcadores inflamatorios sanguíneos se analizarán como variables continuas utilizando PROC MIXED. Las diferencias en estos analitos entre vacas sin eventos frente a las vacas con uno o más eventos, se analizarán por período (semanas). El modelo considerará la paridad (primíparas y multíparas), la CC, la semana y la salud (sin evento, un evento, múltiples eventos) como efectos fijos y sus interacciones. La fecha de parto, será incluida como covariable. Serán examinados la normalidad y homogeneidad de varianzas.

Se realizará el procedimiento CORR de SAS para determinar los coeficientes de correlación de Pearson entre los indicadores sanguíneos para cada periodo (preparto y posparto).

Los puntos de corte de máxima sensibilidad y especificidad para los distintos predictores de enfermedades serán determinados por el índice de Yuden. Además para describir el nivel de asociación entre el metabolitos y otros factores de riesgo de interés y los resultados de salud, los datos serán analizados mediante regresión logística para probar si los diferentes metabolitos sanguíneos son capaces de predecir el riesgo de enfermedad calculando la razón de probabilidad (odds ratio, OR).

Diferencias serán consideradas significativas con $P \leq 0,05$.

7) REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Adrien, L., Mattiauda, D., Artegoitia, V., Carriquiry, M., Motta, G., Bentancur, O., Meikle, A., 2012. Nutritional regulation of body condition score at the initiation of the transition period in primiparous and multiparous dairy cows under grazing conditions: milk production, resumption of postpartum ovarian cyclicity and metabolic parameters. *Animal* 6, 292–299.

Aye, I.L., Gao, X., Weintraub, S.T., Jansson, T., Powell, T.L. 2014. Adiponectin inhibits insulin function in primary trophoblasts by PPAR α -mediated ceramide synthesis. *Molecular Endocrinology* Mol Endocrinol. 28(4):512-24.

Bauchart, D., D. Durand, D. Gruffat and Y. Chilliard. 1998. Mechanism of liver steatosis in early lactation cows: effects of hepatoprotector agents. Pages 27-37 in 60th Meeting of Cornell nutrition conference for feed manufacturers. Ithaca, NY.

Beaudeau, F., Seegers, H., Ducrocq, V., Fourichon, C., Bareille, N. 2000. Effect of health disorders on culling in dairy cows: a review and a critical discussion. *Ann Zootech* 49, 293–311.

Bell, A.W. 1995. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of Animal Science* 73, 2804-819.

Bendixen, P.H., Vilson, B., Ekesbo, I., Åstrand, D.B. 1986. Disease frequencies of tied zero-grazing dairy cows and of dairy cows on pasture during summer and tied during winter. *Preventative Veterinary*

Medicine 4, 291-306.

Bertoni, G., Trevisi, E., Lombardelli, R. 2009. Some new aspects of nutrition, health conditions and fertility of intensively reared dairy cows. *Ital. J. Anim. Sci.* vol. 8, 491-518, 2009.

Bionaz, M., Trevisi, E., Calamari, L., Librandi, F., Ferrari, A., Bertoni, G. P. 2007. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. *J Dairy Sci*; 90: 1740- 50.

Blache, D., Celi, P., Blackberry, M.A., Dynes, R.A., Martin, G.B. 2001. Decrease in voluntary feed intake and pulsatile luteinizing hormone secretion after intracerebroventricular infusion of recombinant bovine leptin in mature male sheep. *Reprod. Fertil. Dev.* 12, 373–381.

Bruun, A., Ersbøll, A.K., Alban, L. 2002. Risk factors for metritis in Danish dairy cows. *Preventative Veterinary Medicine* 54, 179-190.

Burton, J.L., Madsen, S.A., Chang, L.C., Weber, P.S.D., Buckham, K.R., van Dorp, R., Hickey, M.C., Earley, B. 2005. Gene expression signatures in neutrophils exposed to glucocorticoids: a new paradigm to help explain “neutrophil dysfunction” in parturient dairy cows. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 105, 197–219.

Butler, S.T., Marr, A.L., Pelton, S.H., Radcliff, R.P., Lucy, M.C., Butler, W.R. 2003. Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. *J. Endocrinol.* 176, 205–217.

Carson, M.E. 2008. The association of selected metabolites in peripartum dairy cattle with health and production. MSc Thesis, University of Guelph.

Cavestany, D., Blanc, J.E., Kulcsar, M., Uriarte, G., Chilbroste, P., Meikle, A., Febel, H., Ferraris, A., Krall, E. 2005. Studies of the transition cow under a pasture-based milk production system: metabolic profiles. *J. Vet. Med. A* 52, 1 –7.

CDIC. 2011. Culling and replacement rates in dairy herds in Canada. Available at:

http://www.dairyinfo.gc.ca/index_e.php?s1=dff-fcil&s2=mrr-pcle&page=culling.

Chan, J.P.W., Chu, C.C., Fung, H.P., Chuang, S.T., Lin, Y.C., Chu, R.M., Lee, S.L. 2004. Serum haptoglobin concentration in cattle. *J. Vet. Med. Sci.* 66, 43–46.

Chilbroste, P., Mattiauda, D., Soca, P., Bentancour, O., Meikle, A. 2012b. Effect of herbage allowance on grazing behaviour and productive performance of early lactation primiparous Holstein cows. *Animal Feed Science and Technology*, 173: 201-209.

Curtis CR et al. 1985. *J Dairy Sci* 68, 2347–2360.

Deng, J y P E.Scherer. 2010. Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci.*2010 November;1212: E1-E19. Doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05878.x.

DIEA. 2011. Anuario Estadístico Agropecuario 2011. [En línea]. Montevideo : MGAP. 246p.

Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/Dieaanterior/Anuario2011/DIEA-Anuario-2011-web.pdf>.

DIEA 2012. Anuario Estadístico Agropecuario 2012. [En línea]. Montevideo : MGAP. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/Dieaanterior/Anuario2012/DIEA-Anuario-2012web.pdf>.

Drackley, J. K. 1999. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? *J. Dairy Sci.* 82:2259-2273.

Dubuc J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Walton, J. S., LeBlanc, S. J. 2011. Effects of postpartum uterine diseases on milk production and culling in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94:1339–1346.

Duffield T.F., Lissemore, K.D., McBride, B.W., Leslie, K.E. 2009. Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *J. Dairy Sci.* 92 571–580.

Duffield, T., LeBlanc S, Leslie K. 2005. Impact of subclinical metabolic disease on risk of early lactation culling. *J Dairy Sci.* 88(Suppl. 1).

Ecersall, P. D. 2000. Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of diseases in animals. *Rev. Med. Vet. (Toulouse)* 151:577-584.

Elsasser, T.H., Steele, N.C., Fayer, R. 1995. Cytokines, stress and growth modulation. In: M.J Myers and M.P. Murtaugh (eds.) *Cytokines in animal health and disease*. Marcel Dekker Inc., New York, NY, USA.

- Esposito, G., Irons, P.C., Webb, E.C., Chapwanya, A. 2014. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows, *Animal Reproduction Science* 144 (2014) 60–71.
- Fourichon, C., Seegers, H., Bareille, N., Beaudeau, F. 1999. Effects of disease on milk production in the dairy cow: a review. *Prev Vet Med* 41, 1-35.
- Galvão K, Felipe M, Brittin S, Sper R, Fraga M, Galvão J, Caixeta L, Guard C, Ricci A, Gilbert R. 2012. Evaluation of cytokine expression by blood monocytes of lactating Holstein cows with or without postpartum uterine disease. *Theriogenology* 77, 356–372.
- Goff, J. P. 2006. Major Advances in Our Understanding of Nutritional Influences on Bovine Health *J. Dairy Sci.* 89:1292–1301.
- Goff, J.P., Horst, R.L. 1997. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J. Dairy Sci.* 80:1260-1268.
- Gong, J.G., Lee, W.J., Garnsworthy, P.C., Webb, R. 2002. Effect of dietary-induced increases in circulating insulin concentrations during the early postpartum period on reproductive function in dairy cows. *Reproduction* 123: 419-427.
- Gröhn, Y., Rajala-Schultz, J., Allore, H. G., DeLorenzo, M. A., Hertl, J. A., Galligan, D. T. 2003. Optimizing replacement of dairy cows: modeling the effects of diseases. *Prev. Vet. Med.* 61, 27-43.
- Grummer, R.R. 1995. Impact of Changes in Organic Nutrient Metabolism on Feeding the Transition Dairy Cow. *Journal of Animal Science* 73, 2820-2833.
- Hammon, D. S., Evjen, I. M., Dhiman, T. R., Goff, J. P., Walters, J. L. 2006. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 113(1-2):21-29.
- Herdt, T. H. 2000. Ruminant adaptation to negative energy balance. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 16:215–230.
- Huzzey, J., Duffield, T., LeBlanc, S., Veira, D., Weary, D., von Keyserlingk, M. 2009. Short communication: haptoglobin as an early indicator of metritis. *J. Dairy Sci.* 92, 621–625.
- Huzzey, J.M., Veira, D.M., Weary, D.M., von Keyserlingk, M.A.G. 2007. Prepartum behaviour and dry matter intake identify dairy cows at risk for metritis. *J Dairy Sci* 90, 3220-3233.
- Ingvarlsen, K.L. 2006. Feeding and management related diseases in the transition cow. Physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding-related diseases. *Animal Feed Science and Technology* 126, 175-213.
- Ingvarlsen, K.L., Andersen, J.B., 2000. Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. *J. Dairy Sci.* 83, 1573–1597.
- Ingvarlsen, K.L., Dewhurst, R.J., Friggens, N.C. 2003. On the relationship between lactational performance and health; is it yield or metabolic imbalance that causes production diseases in dairy cattle? A position paper. *Livestock Production Science* 73, 277-308.
- James, R.W., and S.P. Deakin. 2004. The importance of high-density lipoproteins for paraoxonase - 1 secretion, stability, and activity. *Free Radic. Biol. Med.* 12:1986–1994.
- Jorritsma, R., Jorritsma, H., Schukken, Y.H., Bartlett, P.C., Wensing, T., Wentink, G.H. 2001. Prevalence and indicators of post partum fatty infiltration of the liver in nine commercial dairy herds in The Netherlands. *Livest. Prod. Sci.* 68, 53–60.
- Jortay, J., Senou, M., Abou-Samra, M., Noel, L., Robert, A., Many, M.C. 2012. Adiponectin and skeletal muscle: pathophysiological implications in metabolic stress. *Am J Pathol* ;181:245–56.
- Kadowaki, T., Yamauchi, T. 2005. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev*;26:439–51.
- Katho, N. 2002. Relevance of apolipoproteins in the development of fatty liver and fatty liver-related peripartum diseases in dairy cows. *J. Vet. Med. Sci.* 64:293-307.
- Kehrli, M. E., Neill, J. D., Burvenich, C., Goff, J. P., Lippolis, J. D., Reindardt, T. A., Nonnecke, B. J. 2006. Energy and protein effects on the immune system. Pages 455 - 471 in *Ruminant Physiology*. K. Sejrsen, T. Hvelplund, and M. O. Nielsen, ed. Wageningen Academic Publishers, The-

- Netherlands. Kerestes, M., Faigl, V., Kulcsar, M., Balogh, O., Foldi, J., Febel, H., Chilliard, Y., Huszenicza, G. 2009. Periparturient insulin secretion and whole-body insulin responsiveness in dairy cows showing various forms of ketone pattern with or without puerperal metritis. *Dom Anim Endocrinol* 37, 250-261.
- Kimura, K., Goff, J.P., Kehrl Jr., M.E., Reinhardt, T.A. 2002. Decreased neutrophil function as a cause of retained placenta in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85, 544–550.
- Lacetera, N., Scalia, D., Bernabucci, U., Ronchi, B., Pirazzi, D., Nardone, A. 2005. Lymphocyte functions in overconditioned cows around parturition. *J. Dairy Sci.* 88, 2010–2016.
- LeBlanc, S. 2010. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *Journal of Reproduction and Development* 56, S29-S35.
- LeBlanc, S. J., Leslie, K. E., Duffield, T. F. 2005. Metabolic Predictors of Displaced Abomasum in Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 88:159–170.
- Meikle, A., Cavestany, D., Carriquiry, M., Adrien M.L., Artegoitia, V., Pereira, I., Ruprechter, G., Pessina, P., Rama, G., Fernández, A., Breijo, M., Laborde, D., Pritsch, O., Ramos, J.M., de Torres, E., Nicolini, P., Mendoza, A., Dutour, J., Fajardo, M., Astessiano, A.N., Olazábal, L., Mattiauda, D., Chilibroste, P. 2013. Avances en el conocimiento de la vaca lechera durante el período de transición en Uruguay: un enfoque multidisciplinario. *Agrociencia (Uruguay)*, v.: 17 1, p.: 141 – 152.
- Meikle, A., Kulcsar, M., Chilliard, Y., Febel, H., Delavaud, C., Cavestany, D., Chilibroste, P. 2004. Effects of parity and body condition at parturition on endocrine and reproductive parameters of the cow. *Reproduction* 127, 727 – 737.
- Melendez, P., Marin, M.P., Robles, J., Rios, C., Duchens, M., Archbald, L. 2009. Relationship between serum nonesterified fatty acids at calving and the incidence of periparturient diseases in Holstein dairy cows. *Theriogenology* 72 (2009) 826–833.
- Mulligan, F.J., Doherty, M.L. 2008. Production diseases of the transition cow. *The Veterinary Journal* 176, 3-9.
- Oetzel, G.R., 2004. Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice* 20, 651–674.
- Ohtsuka, H., Koiwa, M., Hatsugaya, A., Kudo, K., Hoshi, F., Itoh, N., Yokota, H., Okada, H., Kawamura, S. 2001. Relationship between serum TNF activity and insulin resistance in dairy cows affected with naturally occurring fatty liver. *J Vet Med Sci* 63, 1021-1025.
- Oikawa, S., Oetzel, G.R. 2006. Decreased insulin response in dairy cows following a four-day fast to induce hepatic lipidosis. *J Dairy Sci* 89, 2999-3005.
- Quiroz-Rocha, G.F., LeBlanc, S.J., Duffield, T., Wood, D., Leslie, K., Jacobs, R.M. 2009. Evaluation of prepartum serum cholesterol and fatty acids concentrations as predictors of postpartum retention of the placenta in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc* 234:790–793
- Reinhardt T, Lippolis J, McCluskey B, Goff J, Horst R. 2011. Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. *The Veterinary Journal* 188: 122-124.
- Ribeiro, E.S., Lima, F.S., Ayres, H., Greco, L.F., Bisinotto, R.S., Favoreto, M., Marsola, R.S., Monteiro, A.P.A., Thatcher, W.W., Santos, J.E.P. 2011. Effect of postpartum diseases on reproduction of grazing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94(E-Suppl. 1):63 (Abstr.).
- Rosen E. y BM. Spiegelman. 2006. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature*. 2006 December 14;444 (7121):847-853. doi:10.1038/nature 05483.
- Rovere G, Sotelo F, Valena J, Slavica J. 2007. Mejoramiento Lechero y el monitoreo reproductivo de los tambos uruguayos [Cd-Rom]. En: IX Congreso Holstein de las Américas; abril 2007; Colonia, Uruguay.
- Sepúlveda P. et al. 2010. XXXV Congreso Sociedad Chilena de Producción Animal, 191–192.
- Sepúlveda P, Weary D, Noro M, von Keyserlingk M. 2015. Transition diseases in grazing dairy cows are related to serum cholesterol and other analytes. *PLOS ONE/ DOI: 10.1371/journal.pone.0122317*

- Smith, J., Ely, L., Chapa, A. 2000. Effect of region, herd size, and milk production on reasons cows leave the herd. *J. Dairy Sci.* 83, 2980–2987.
- Spears, J.W., Weiss, W.P. 2008. Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. *Vet. J.* 176, 70–76.
- Trevisi, E., Amadori, M., Archetti, I., Lacetera, N., Bertoni, G., 2011. Inflammatory response and acute phase proteins in the transition period of high-yielding dairy cows. *Acute Phase Proteins as Early Non-Specific Biomarkers of Human and Veterinary Diseases*, vol. 15. pp. 355–379.
- Turk, R., Juretic, D., Geres, D., Turk, N., Rekic, B., Simeon-Rudolf, V., Svetina, A. 2004. Serum paraoxonase activity and lipid parameters in the early postpartum period of dairy cows. *Res. Vet. Sci.* 76, 57–61.
- Turk, R., Juretic, D., Geres, D., Turk, N., Rekic, B., Simeon-Rudolf, V., Robic, M., Svetina, A. 2005. Serum paraoxonase activity in dairy cows during pregnancy. *Res. Vet. Sci.* 79, 15–18.
- Van Raden, P.M., Sanders, A.H., Tooker, M.E., Miller, R.H., Norman, H.D. 2011. Daughter pregnancy rate evaluation of cow fertility. USDA AIPL research report.
- Van Saun, R.J. 2009. Metabolic profiling. In: Anderson, D.E., Rings, D.M. (Eds.), *Current Veterinary Therapy Food Animal Practice*. WB Saunders Company, Philadelphia, USA, pp. 153–164.
- Van Saun, R.J., Todd, A., Varga, G.A. 2005. Serum mineral concentrations and risk of periparturient disease. *Proceedings of American Association of Bovine Practitioners* 38, 178–179.
- von Keyserlingk, M.A.G., Rushen, J., de Passillé, A.M.B. and Weary, D.M.. 2009. INVITED REVIEW: The Welfare of Dairy Cattle – Key Concepts and the Role of Science. *J. Dairy Sci.* 92: 4101-4111.
- Wallace, R., McCoy, G., Overton, T., Clark, J. 1996. Effect of adverse health events on dry matter consumption, milk production and body weight loss of dairy cows during early lactation. *J. Dairy Sci* 79 (Supl 1): 205.Abstr.
- Walsh, R.B., Kelton, D.F., Duffield, T., Leslie, K.E., Walton, J.S., LeBlanc, S.J. 2007. Prevalence and Risk Factors for Postpartum Anovulatory Condition in Dairy Cows. *J Dairy Sci* 90:315–324.
- Washburn, S.P., White, S.L., Green, J.T.J., Benson, G.A. 2002. Reproduction, mastitis, and body condition of seasonally calved Holstein and Jersey cows in confinement or pasture systems. *Journal of Dairy Science* 85, 105-111.
- White, S.L., Benson, G.A., Washburn, S.P., Green, J.T.J. 2002. Milk production and economic measures in confinement or pasture systems using seasonally calved Holstein and Jersey cows. *Journal of Dairy Science* 85, 62-104.

8) RELEVANCIA E IMPACTO DEL PROYECTO

Como se ha mencionado, la presión metabólica que implica las altas producciones sobre la vaca lechera ha hecho más frágil el delgado equilibrio salud/enfermedad durante el parto. Si bien la producción de conocimiento original en lechería en nuestro país (principalmente sistema pastoril-mixto) es interesante considerando el bajo número de científicos existentes, las áreas se han enfocado a investigar esencialmente aspectos de la nutrición, reproducción con enfoques en comportamiento, endocrinología y metabolismo ruminal y general. Sin embargo, los estudios en salud son escasos, debido principalmente a que reproducir experimentalmente las enfermedades es cuestionable (por varios aspectos) y que estudios observacionales que generen conocimiento nuevo implican una estrategia experimental siendo a su vez impensables sin considerar un gran número de animales. El país ha definido un Plan de Investigación en Salud Animal, justamente debido a la carencia de producción de conocimiento original en un área temática en la que depende nuestra economía.

Esta propuesta es original porque busca indagar respecto a casuística de enfermedades del parto en bovinos de leche en sistemas pastoriles-mixtos. Se espera obtener indicadores metabólicos e inflamatorios sensibles y económicos, capaces de monitorear el parto en la vaca lechera y

relacionarlos con la casuística de las principales enfermedades del posparto para poder realizar medicina preventiva a nivel de predios lecheros. También apunta a evaluar factores de riesgo que puedan afectar dicha casuística e intenta cuantificar el impacto de las enfermedades del periparto sobre la producción, reproducción o el descarte de vacas. Generar conocimiento original en salud en sistemas mixtos de producción de leche (pastoreo con reservas y concentrados), contribuirá a instaurar una estrategia de medicina preventiva adaptada a nuestras condiciones de producción.

9) CAPACIDADES DE INVESTIGACION DEL ASPIRANTE

Yo he realizado una especialización en la Universidad Austral de Chile (1996-98) bajo la tutela del Prof. Dr. Fernando Wittwer quien me introdujera en el uso de perfiles metabólicos como herramienta para el desarrollo de medicina preventiva de rodeos lecheros. Las metodologías de laboratorio a utilizar, ESPECTROFOTOMETRIA Y ELISA son técnicas que se realizan de rutina en el Laboratorio de Técnicas Nucleares. Yo he puesto a punto todas las variables que se determinan por Espectrofotometría en nuestro laboratorio y manejo ya hace un par de años todo lo referente a controles de calidad. Poseo un conocimiento básico de estadística y un manejo elemental de paquetes estadísticos (SAS).

Hay dos aspectos en los que considero tengo que desarrollar capacidades: 1) entrenamiento para el diagnóstico clínico de las diferentes patologías mencionadas, para lo que está planificado entrenamiento con la Dra Mirela Noro y 2) conocimientos de epidemiología y estadística con este enfoque, para lo que se prevé la asistencia a cursos de posgrado en las temáticas específicas.

10) EQUIPOS, INFRAESTRUCTURA Y RECURSOS MATERIALES

Este proyecto, será co-tutoreado por, la Dra Mirela Noro, docente de la Universidad de Unipampa, Brasil; Dr. Jose Luis Repetto, docente del Instituto de Producción Animal Veterinario (IPAV), San José, Facultad de Veterinaria y Dra, Lourdes Adrien, docente de Facultad de Veterinaria Paysandú.

Será realizado con un equipo de trabajo que ha venido desarrollando diversos proyectos en el área de producción lechera, con énfasis en el estudio de la nutrición-producción y reproducción de las vacas lecheras en sistemas de pastoreo. El equipo está integrado por profesionales radicados en la Estación Experimental Dr. Mario A. Cassinoni de la UdelaR, en Paysandú (Ing. Agr. Pablo Chilibroste y Diego Mattiauda, Dr. Jorge Gil, Dra. Lourdes Adrien), radicados en Montevideo de la Facultad de Veterinaria (Dra. Ana Meikle) y en San José, IPAV, (Dr. Jose Luis Repetto, Dra. Cecilia Cajarville e Ing. Agronomo Alejandro Mendoza), en Brasil, (Dra. Mirela Noro) y en Argentina, integrantes de la empresa Lactodiagnóstico (Dr. Carlos Catracchia, Dra. Valeria Gonzalez Pereyra, Dr. Santiago García).

Este proyecto integrará profesionales que trabajan en Facultad de Veterinaria (de Uruguay y Brasil) y Facultad de Agronomía y profesionales de ejercicio liberal de Argentina lo que será el puntapié para iniciar trabajos regionales en el área de salud de vacas lecheras.

Todas las metodologías que se utilizarán en el proyecto están debidamente desarrolladas en el país y las nuevas serán desarrolladas por los equipos de trabajo altamente capacitados.

Los animales requeridos para el desarrollo de los trabajos provendrán de la Estación Experimental “Dr. Mario A. Cassinoni” de la Facultad de Agronomía en Paysandú y el trabajo poblacional se desarrollara en dos tambos comerciales.

Los experimentos de la etapa2 serán financiados por mi tutor principal de Doctorado, Dra. Mirela Noro y por proventos del Laboratorio de Técnicas Nucleares, mientras que el experimento de la etapa 1 lo financiará el Proyecto Innovagro del cual la Dra. Lourdes Adrien es responsable. Además dispongo de mi alícuota de dedicación total para solventar gastos de reactivos.

