



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA INMUNE Y METABÓLICO EN
VACAS PRIMÍPARAS Y MULTÍPARAS DURANTE EL PERIODO DE
TRANSICIÓN Y SU ASOCIACIÓN CON PATOLOGÍAS DEL
PERIPARTO**

Autor: YANELA PURTSCHER

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

URUGUAY

2019



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA INMUNE Y METABÓLICO EN
VACAS PRIMÍPARAS Y MULTÍPARAS DURANTE EL PERIODO DE
TRANSICIÓN Y SU ASOCIACIÓN CON PATOLOGÍAS DEL
PERIPARTO**

Autor: YANELA PURTSCHER

Dra. Lourdes Adrien
Director de Tesis

Dr. José Piaggio
Co-director

2019

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

**Dra. Ana Meikle
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República, Uruguay**

**Dr. Martín Breijo
Facultad de Medicina
Universidad de la República, Uruguay**

**Dr. Edgardo Giannechini
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República, Uruguay**

2019



FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAESTRÍA EN
SALUD ANIMAL

**“CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA INMUNE Y METABÓLICO
EN VACAS PRIMÍPARAS Y MULTÍPARAS DURANTE EL
PERIODO DE TRANSICIÓN Y SU ASOCIACIÓN CON
PATOLOGÍAS DEL PERIPARTO”**

Por: Dra. Yanela Esther Purtscher Hernández

Directora de Tesis: Dra. Lourdes Adrién
Codirector de Tesis: Dr. José Piaggio

Tribunal

Presidente: Dra. Ana Meikle

Segundo Miembro: Dr. Martín Breijo

Tercer Miembro: Dr. Edgardo Gianneechini

Fallo del Tribunal: Aprobada BBB

Salón Nuevo Plan
Viernes 12 de abril de 2019

El Fallo de aprobación de la Tesis puede ser: Aprobada (corresponde a la nota BBB- en el Acta), o Aprobada con Mención (corresponde a la nota SSS- 12 en el Acta)

AGRADECIMIENTOS

A mi marido Diego por su apoyo incondicional, y a mis hijas Carmela y Guillermina.

A mi directora de tesis Lourdes Adrien, por su paciencia y dedicación.

A mi amiga y colega Andrea Martin, por ayudarme en el procesamiento de las muestras de Lascano.

A Bernardo Lockhart y la empresa Olam por permitirme realizar parte del ensayo en sus tambos. A mis compañeros y colaboradores de Estancias del Lago, por cubrir mi puesto mientras realizaba los cursos de posgrado.

A la ANII por otorgarme la beca de maestría (código POS_NAC_2013_1_11546), y en especial por el financiamiento de parte del proyecto mediante el Fondo María Viñas (código FMV_3_2013_1_100855).

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.....	1
2.1 Lechería en Uruguay.....	1
2.2 La vaca lechera en el período de transición.....	2
2.3 Enfermedades del periparto y lactancia temprana.....	7
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS.....	8
4. HIPÓTESIS.....	9
5. OBJETIVO GENERAL.....	9
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
7.1 Animales y diseño experimental.....	11
7.2 Determinaciones.....	12
7.3 Criterio para la definición de enfermedades.....	13
7.4 Análisis estadístico.....	13
8. RESULTADOS.....	15
8.1 Incidencia de enfermedades.....	15
8.2 Producción leche corregida por grasa 4%	15
8.3. Composición de leche: porcentaje de grasa, proteína y lactosa....	16
8.4 Recuento de células somáticas en leche.	17
8.5 Estado corporal.....	17
8.6 Metabolitos sanguíneos.....	18
8.6.1 Ácidos grasos no esterificados.....	18
8.6.2 Betahidroxibutirato.....	19
8.6.3 Proteínas totales y globulinas.....	20
8.6.4 Albúmina.....	21
8.6.5 Urea.....	21
8.6.6 Colesterol.....	21
8.6.7 Calcio sanguíneo.....	22
8.7 Haptoglobina.....	23
8.8 Recuento de glóbulos rojos, blancos, hemoglobina, índices hematimétricos y clasificación de los leucocitos.....	24
9. DISCUSIÓN.....	26
10. CONCLUSIONES.....	31
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estudiar algunos parámetros del sistema inmune y metabólico de vacas lecheras primíparas y múltiparas, durante el período de transición, asociado con el estado de salud. El trabajo se desarrolló en dos tambos de Uruguay y tuvo un diseño de cohorte prospectivo, en el cual, en cada establecimiento se trabajó con una población de animales que fue monitoreada desde el parto hasta el posparto. Los establecimientos lecheros donde se hizo este trabajo, fueron designados como Tambo 1 y Tambo 2. En el Tambo 1 se realizó el relevamiento de problemas de salud que ocurrieron desde el parto hasta los 30 días posparto. En el Tambo 2 se monitorearon las vacas desde el mes antes del parto, hasta los dos meses posparto y se extrajeron muestras de sangre y leche. En esas muestras se analizó la concentración de ácidos grasos no esterificados (NEFA), β -hidroxibutirato (BHB), albúmina, proteínas totales, colesterol, urea y calcio. Además, se realizó hemograma completo y análisis de haptoglobina. Del total de vacas incluidas en este trabajo, el 20% presentó enfermedad clínica en los primeros dos meses posparto (14,9% en Tambo 1, 29,8% en Tambo 2), siendo la mastitis la enfermedad clínica más frecuente (Tambo 1 11,5%, Tambo 2 23,4%). En este trabajo los resultados vinculados al sistema inmune, la salud y el estatus metabólico no concuerdan con la bibliografía internacional, generada en general, en sistemas estabulados con alimentación *ad libitum*, donde la gran movilización de las reservas grasas parece ser uno de los principales problemas asociados a la incidencia de enfermedades. Pero se encontró que el perfil de proteínas totales y globulinas fue un buen indicador de los procesos inflamatorios/infecciosos, en conjunto con la haptoglobina sérica en los casos de metritis, los cuales pueden ser buenos parámetros para monitorear el estado de salud de los animales.

SUMMARY

The objective of this work was to study some parameters of the immune and metabolic system of primiparous and multiparous dairy cows, during the transition period, associated with the state of health. The work was carried out in two farms in Uruguay and had a prospective cohort design, in which each group worked with a group of animals that was monitored from prepartum to postpartum. The dairy farms of this work were designated as Farm 1 and Farm 2. In the Farm 1, a survey of health problems that occurred from calving to 30 days postpartum was carried out. In the Farm 2, the cows were monitored from the month before calving until the two months postpartum and blood and milk samples were collected. Non-esterified fatty acids (NEFA), β -hydroxybutyrate (BHB), cholesterol, total protein, albumin, urea, and calcium were determined, and a complete blood count and haptoglobin analysis were performed. Of the total number of cows included in this study, 20% presented clinical disease in the first two months postpartum (14.9% in Farm 1, 29.8% in Farm 2), with mastitis being the most frequent clinical disease (Farm 1 11.5%, Farm 2 23.4%). In this work, the results referring to the immune system, health and metabolic status do not agree with the international literature, generally generated in confinement systems with *ad libitum* feeding, where the great mobilization of fat reserves seems to be one of the main problems associated with the high incidence of diseases. But it was found that the profile of total proteins and globulins was a good indicator of inflammatory / infectious processes, in conjunction with serum haptoglobin in cases of metritis, which can be good parameters to monitor the health status of animals.

1. INTRODUCCIÓN

El periodo de transición en la vaca lechera se encuentra comprendido entre las 3 semanas previas al parto y las 3 semanas posteriores al parto (Grummer, 1995). En este periodo las vacas deben enfrentar varios desafíos: el repentino y marcado aumento de los requerimientos nutricionales para la producción de leche, que coincide con un descenso en el consumo de materia seca (Drackley, 1999). La disminución del consumo de materia seca puede llegar hasta un 30%, siendo esta una de las causas del balance energético negativo (BEN) (Grummer, 1995; Grummer y col., 2004), debido a que la energía consumida no es suficiente para cubrir los requerimientos (Drackley, 1999). La diferencia entre la energía requerida y la consumida, debe ser alcanzada por la movilización de las reservas corporales, que se refleja en el aumento de ácidos grasos no esterificados y β -hidroxibutirato (Ingvarsen y col., 2003).

En este período, la competencia del sistema inmune disminuye, lo que es un factor de riesgo para la enfermedad (Ingvarsen y col., 2003). El número total de neutrófilos y linfocitos disminuye gradualmente desde las 2 a 3 semanas antes del parto, llegando al mínimo los días 0 a 2 luego del parto, recuperándose gradualmente entre las 2 a 4 semanas posparto (Kimura y col., 2014). La magnitud de la movilización de reservas corporales y el consecuente aumento de AGNE y BHB tiene un impacto directo sobre el sistema inmune (neutrófilos, linfocitos) (Sato y col., 1995). Al desbalance metabólico y la inmunosupresión, se le agregan otros factores estresantes asociados al parto y al inicio de lactancia, lo cual contribuye a la alta incidencia de enfermedades durante el periodo de transición (Drackley, 1999). Todo esto provoca que aproximadamente el 75% de las enfermedades de las vacas lecheras ocurran durante el primer mes posparto (LeBlanc y col., 2006).

Las enfermedades vinculadas al período de transición están asociadas directamente a trastornos metabólicos (como hipocalcemia, hipomagnesemia, cetosis), o indirectamente: retención de placenta, metritis, desplazamiento de abomaso, mastitis, laminitis (Mulligan y Doherty, 2008). A su vez, un factor de riesgo muy relevante para la incidencia de enfermedades es la paridad: las vacas primíparas presentan más casos de metritis con relación a las multíparas (Galvão y col., 2012) y las vacas multíparas presentan mayor incidencia de hipocalcemia (Reinhardt y col., 2011). Desconocemos la existencia de trabajos nacionales que hayan estudiado la ocurrencia de enfermedades y su relación con la inmunosupresión de la vaca lechera primípara y multípara en condiciones de pastoreo.

2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

2.1. Lechería en Uruguay

En Uruguay la lechería se desarrolla principalmente con alimentación de base pastoril, contrario a lo que sucede especialmente en Estados Unidos y otros países de mayor desarrollo, en donde el confinamiento constante es la forma productiva más frecuente. Resulta evidente que las vacas en confinamiento logran mayor producción de leche que en pastoreo. Trabajos internacionales han demostrado que las vacas alimentadas en sistemas con dietas totalmente mezcladas, en confinamiento, alcanzan mayor producción de leche (Kolver y Müller, 1998; Bargo y col., 2002). En este sentido, durante las últimas décadas las vacas lecheras han sido sometidas a una intensa selección genética a nivel mundial, provocando un aumento de producción de leche individual y Uruguay no ha escapado de este escenario mundial. La producción de leche se ha incrementado a nivel nacional en los últimos años, alcanzando en el ejercicio 2016/2017 los 2049 millones de litros de leche por año. El incremento en la producción de leche se ha basado principalmente en el aumento en la producción por vaca masa (DIEA, 2018), debido a que se ha mantenido el número de animales en la última década y ha disminuido la superficie total de tambos. Este incremento en la producción ha ocurrido por diversos factores, pero ha habido cambios estructurales en los sistemas de producción del país, con aumento de la carga de estos, lo que ha determinado que la alimentación basada en el consumo de pasto de cosecha directo (pastoreo) represente entre el 48 y 54% de la dieta de los animales en el año (Chilibroste y Battegazzore, 2014; Chilibroste 2015) y el resto se completa con la suplementación de reservas y concentrados. A pesar de estos cambios, todavía los animales no logran alcanzar su máximo potencial productivo debido principalmente al desacople entre los requerimientos y oferta de nutrientes (Chilibroste y col., 2012).

Por otra parte, la eficiencia reproductiva del rodeo lechero a nivel mundial y nacional ha venido disminuyendo en consecuencia a la presión por selección de los animales para la producción de leche. En nuestro país, el estudio de 200.000 lactancias indicó que el intervalo parto concepción aumentó de 131 a 150 días de 1997-2001 a 2001-2005 (Rovere y col., 2007).

2.2. La vaca lechera en el período de transición

Durante el período de transición, definido por Grummer (1995) como el periodo desde 3 semanas previas al parto hasta las 3 semanas posparto, la vaca lechera sufre cambios muy drásticos, que implica un desafío intenso que no ocurre en otra etapa de la lactancia o gestación (Grummer, 1995; Drackley, 1999; Ingvarsen y col., 2003). Estos cambios ocurren tanto a nivel endócrino, metabólico, nutricional e inmune.

A nivel nutricional, la vaca con gestación avanzada ve comprometida su capacidad de consumo, lo ingerido no alcanza para cubrir sus requerimientos (BEN), provocando la movilización de las reservas de grasa. Este periodo de BEN es fisiológico en la vaca lechera, pero especialmente en nuestras condiciones pastoriles puede ser de fuerte impacto, ya que dicha base alimenticia presenta menos calorías que los concentrados, provocando un BEN más pronunciado que en vacas en confinamiento (Ribeiro y col.,

2013). La gran movilización de reservas provoca una elevación de las concentraciones circulantes de los ácidos grasos no esterificados (AGNE o NEFA en inglés) (Pedron y col., 1993; Burke y Roche, 2007). Las vacas con mayor estado corporal al parto presentan mayor lipomovilización, y por lo tanto mayores concentraciones de AGNE al inicio de lactancia (Meikle y col., 2004; Adrien, 2010). Si el flujo de AGNE al hígado excede su habilidad de oxidarlos completamente, aumentan los cuerpos cetónicos (BHB, acetona y acetoacetato), metabolitos intermediarios de la oxidación completa de los AGNE. Entonces, los AGNE reflejan la magnitud de la movilización grasa desde las reservas, mientras que BHB indica en qué medida los AGNE que llegan al hígado son oxidados completamente. La medición de AGNE y BHB en sangre puede dar un indicio del éxito en la adaptación al período de transición (Duffield y col., 2009). Con respecto a la utilización de estos metabolitos, los AGNE en sangre son captados por la glándula mamaria para la producción de grasa láctea, siendo este mecanismo muy importante en los primeros días de lactancia ya que en este periodo el 40% de la grasa láctea es producida mediante este mecanismo (Adewuyi y col., 2005). Los cuerpos cetónicos pueden ser usados por los músculos como una fuente de energía alternativa a la glucosa, sin embargo, esta vía no es tan efectiva en obtención de energía como lo es la oxidación completa de ácidos grasos (Duffield y col., 2009). Cuando los cuerpos cetónicos exceden la capacidad de utilización de los tejidos periféricos, se acumulan en el torrente sanguíneo, eliminándose a través de leche y orina, produciéndose la enfermedad llamada cetosis. Las vacas con cetosis reducen el consumo, disminuyen la producción de leche, y en casos graves pueden existir alteraciones en el sistema nervioso central como pérdida de la coordinación, ceguera y euforia (Adewuyi y col., 2005).

Los cambios en la proteína corporal son menores en relación a los cambios en lípidos corporales, por lo que por mucho tiempo fueron ignorados. La proteína corporal es una fuente de precursores de leche (ya que sus carbonos pueden ser utilizados para proteína láctea o lactosa), y en determinadas situaciones (como enfermedad) pueden utilizarse como reservas a corto plazo (Ingvarsen y col., 2003). Los valores de albúmina y urea son buenos indicadores del nivel proteico de la alimentación (Meikle y col., 2013).

El sistema endócrino tiene como principal desafío el inicio de la lactancia. Las principales hormonas vinculadas a este hecho son la hormona de crecimiento (GH) y la prolactina, las cuales aumentan. El aumento de GH provoca que la glucosa sea utilizada por la ubre primordialmente: el resto de los tejidos periféricos deben utilizar otras fuentes de energía (por ejemplo, cuerpos cetónicos). La GH además estimula la lipólisis. La gran movilización de reservas, acompañada por una disminución de las hormonas anabólicas, insulina y factor insulino similar (IGF-I) (Meikle y col., 2004; Pereira y col., 2010; Cavestany y col., 2009; Adrien y col., 2012) favorecen el catabolismo periférico que soporta a la lactancia. Por lo tanto, aquellas vacas con mayor mérito genético para la producción de leche tienen mayores concentraciones de GH, y menores concentraciones de insulina e IGF-I al inicio de la lactancia (Gong, 2002).

Adicionalmente al desbalance energético, ocurren otros eventos que contribuyen a la ocurrencia de enfermedades durante el periodo de transición. El inicio de la lactancia provoca un aumento en los requerimientos de calcio, en un momento en el cual no es posible aumentar el ingreso de calcio debido a la disminución del consumo. La calcemia puede caer tanto, que puede provocar que la vaca no pueda mantenerse en pie (hipocalcemia clínica, o “fiebre de la leche”), dado que el calcio es esencial para el funcionamiento muscular y nervioso. Una hipocalcemia menos severa (hipocalcemia subclínica) puede provocar disminución de consumo, baja motilidad ruminal e intestinal, baja productividad y aumentar la susceptibilidad a enfermedades metabólicas e infecciosas (Goff, 2008). En 2006, Kimura y col., demostraron que las reservas de calcio intracelular de linfocitos disminuyen cuando el calcio plasmático disminuye por la demanda de la lactancia, sugiriendo que este hecho contribuye a la inmunosupresión del periparto.

Además, por lo general las vacas recién paridas deben sufrir un cambio drástico en la dieta, lo cual causa disturbios digestivos (Mulligan y Doherty, 2008). Sumado a esto, deben experimentar cambios ambientales al ser separadas de su grupo original en el parto e integradas a un nuevo grupo de vacas en lactancia. Todos estos factores asociados, sumados a los disturbios en el sistema inmune, provocan que aproximadamente el 75% de las enfermedades de las vacas lecheras ocurra durante el primer mes posparto (LeBlanc y col., 2006).

La competencia inmune, definida como la habilidad para resistir a la infección, está afectada por los cambios que ocurren en el metabolismo de vacas lecheras en el parto (Ingvarsten y col., 2003). La inmunodeficiencia que caracteriza al periodo de transición es evidente por la disminución de las globulinas plasmáticas y por el incremento de las patologías infecciosas reproductivas, mamarias, podales y otras (Blowey, 2005). La severidad de la inmunodeficiencia se incrementa aún más debido a ciertos factores inherentes al parto: BEN, hipocalcemia y altos niveles de cortisol (Mulligan y Doherty, 2008).

Los leucocitos expresan receptores funcionales a varias hormonas que participan en la homeostasis y homeorresis del parto de la vaca lechera, por lo tanto, todos los cambios en hormonas y metabolitos que ocurren durante este periodo afectarán directa o indirectamente la competencia inmune (Ingvarsten y col., 2003). El aumento de glucocorticoides cercano al parto contribuye a la inmunosupresión debido a que altera la secreción de proteínas necesarias para el normal funcionamiento inmune humoral y celular. Durante las últimas semanas de preñez y en lactancia temprana, la hormona de crecimiento (GH) y la prolactina aumentan, mientras que la insulina, hormona insulino-símil (IGF-1) y leptina disminuyen dramáticamente. La GH y prolactina estimulan la hematopoyesis, la proliferación de células linfoides, la producción de radicales hidróxidos, estimulan la fagocitosis y la producción de anticuerpos; por lo cual dichas hormonas estimulan el sistema inmune. El IGF-1, insulina y leptina también estimulan el sistema inmune, pero como su concentración se reduce considerablemente en el

periparto, la competencia inmune puede verse alterada. El IGF-1 estimula el tamaño y la celularidad de los órganos linfoides, y la funcionalidad de los linfocitos. La insulina estimula el metabolismo oxidativo (Ingvarsen y col., 2003).

La movilización de reservas energéticas y los metabolitos producidos durante el periparto también afectan la funcionalidad del sistema inmune. La movilización lipídica provoca un aumento de la concentración de AGNE en sangre, el hígado capta los AGNE y éstos se acumulan como triglicéridos. Cuando la infiltración lipídica es severa (conocida como lipodosis hepática o síndrome del hígado graso) se afecta el normal funcionamiento del hígado, aumentando la incidencia de problemas en la salud, y en casos extremos puede llevar a la muerte del animal (Drackley, 1999). Se ha demostrado que altos niveles de triglicéridos en el hígado afectan el sistema inmune de diversas maneras: disminuye la capacidad funcional de neutrófilos (o polimorfonucleares, PMN), se reduce la producción de INF- γ por parte de leucocitos, disminuye la secreción de proteínas inmunes importantes, como las proteínas de fase aguda (Ingvarsen y col., 2003). Los PMN son los leucocitos mayormente involucrados en la fagocitosis bacteriana durante una infección; se ha demostrado que el BEN reduce su funcionalidad, especialmente su capacidad de matar bacterias. Esto es debido a que las reservas de glucógeno parecen ser el mayor combustible para la destrucción bacteriana, y durante el BEN esas reservas disminuyen notoriamente (Galvão y col., 2010), y esto contribuye al incremento de la incidencia de mastitis y metritis posparto (Nagahata y col, 1987; Kehrlí y col, 1989; Cai y col, 1994). Por otro lado, las células inmunes contienen altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados en su membrana celular sensibles al stress oxidativo, por lo que son vulnerables a la oxidación lipídica (Mulligan y Doherty, 2008). Otra consecuencia de la movilización lipídica es la hipercetonemia. Los cuerpos cetónicos reducen la liberación de mediadores de la inflamación, alteran la quimiotaxis de leucocitos y la defensa fagocítica. Leucocitos incubados con BHB reducen la actividad del estallido respiratorio, mientras que PMN y macrófagos incubados con BHB o acetona mostraron menor actividad fagocítica. Altas concentraciones de cuerpos cetónicos en suero pueden suprimir la blastogénesis linfocítica (Ingvarsen y col., 2003).

El status proteico también tiene efecto sobre el sistema inmune. La baja concentración de proteínas en plasma, especialmente aquellas sintetizadas en el hígado como la albumina, indica un bajo status proteico. La glutamina es un aminoácido no esencial que se encuentra principalmente en los músculos esqueléticos; cuando existe una depleción en el nivel de glutamina libre en el músculo, implica un balance proteico negativo. La glutamina es un combustible muy importante tanto para PMN como para neutrófilos. Estudios en los cuales se suplementa animales con glutamina mostraron efectos benéficos en la función inmune. In vitro se demostró que la glutamina induce la proliferación de linfocitos-T, la diferenciación de linfocitos-B, la fagocitosis en macrófagos y la producción de citoquinas (Ingvarsen y col., 2003).

Para identificar problemas en el sistema inmune es necesario buscar parámetros comunes que permitan caracterizarlo. Para esto es necesario buscar indicadores que puedan ser medibles y monitoreados, y que puedan predecir enfermedades o al menos, permitir la identificación temprana de una enfermedad. Como predictor de la inflamación en bovinos se ha estudiado a la haptoglobina (Eckersall, 1995). Los leucocitos presentes en la inflamación liberan citoquinas, las cuales desencadenan un amplio rango de respuestas patofisiológicas, como pirexia, leucocitosis y alteraciones hormonales (por ejemplo, aumento de cortisol). Además, las citoquinas estimulan la producción por parte del hígado de proteínas plasmáticas conocidas como proteínas de fase aguda: proteína C-reactiva, Amiloide sérico, haptoglobina, ceruloplasmina, fibrinógeno, antiproteasa α -1 y glicoproteína ácida α -1 (Eckersall, 1995). Diferentes mamíferos producen distintas proteínas de fase aguda. La haptoglobina es la proteína de fase aguda más importante en rumiantes; actúa uniéndose al hierro y lo inutiliza para las bacterias patógenas, por lo que inhibe la proliferación bacteriana. La haptoglobina se eleva bajo situaciones de inflamación y debido a su capacidad de unirse a la hemoglobina se han desarrollado métodos para su medición. El aumento de la concentración de haptoglobina se asocia con lesiones agudas y subagudas, mientras que en la mayoría de los animales con infecciones crónicas este analito no difiere de animales sanos (Eckersall, 1995). La haptoglobina puede ser utilizada como marcador temprano de metritis clínica posparto, debido a que las vacas con mayor concentración sanguínea en el posparto, tienen mayor riesgo de presentar esta enfermedad. En un estudio en el cual se compararon diferentes severidades de metritis, se evidenció que vacas con metritis grave tienen mayor concentración de haptoglobina que aquellas con metritis moderada. Este estudio determinó que animales con más de 1g/L de haptoglobina se podrían considerar enfermos (Huzzey y col., 2009). Drillich y col. en el 2007, observaron mayor concentración de haptoglobina al momento del diagnóstico de metritis clínica posparto, en comparación con vacas sanas, y dicha concentración disminuía luego del tratamiento con antibióticos. Se ha estudiado que la haptoglobina aumenta en sangre y leche cuando existe mastitis, debido a que existe cierta producción de haptoglobina intramamaria ante una agresión (Ceciliani y col., 2012). También se ha investigado haptoglobina en enfermedades respiratorias bacterianas en terneros, pudiendo determinar la severidad de la enfermedad según la concentración de haptoglobina encontrada en suero: las infecciones respiratorias más graves (que incluso provocaban la muerte del animal) se corresponden con concentraciones más altas de haptoglobina. La infección con virus en este caso no produjo aumento de haptoglobina (Godson y col., 1996). Sin embargo, este indicador de inflamación no es específico, pudiendo aumentar por ejemplo en caso de distocia (Duffield y LeBlanc, 2009).

El hemograma también puede ser un parámetro común que identifique problemas en el sistema inmune, y es un análisis que permite analizar los tres principales grupos de células que circulan por la sangre: leucocitos, eritrocitos y plaquetas; pudiéndose determinar el estado de salud de los animales, y de esta forma, permitir orientar al profesional en la búsqueda de una patología (Willard y Tvedten, 2012).

2.3. Enfermedades del periparto y lactancia temprana

Las enfermedades vinculadas al período de transición están asociadas directamente a trastornos metabólicos (como hipocalcemia, hipomagnesemia, cetosis), o indirectamente: retención de placenta, metritis, desplazamiento de abomaso, mastitis, laminitis (Mulligan y Doherty, 2008). Todas estas enfermedades se encuentran interrelacionadas; por ejemplo, vacas que llegan al parto con un excesivo estado corporal seguramente desarrollarán cetosis e hígado graso, alterando el sistema inmune, siendo más proclives a la invasión de microorganismos. La invasión de microorganismos hace que se desencadene una respuesta inmune, estimulando la multiplicación de células inmunes, provocando fiebre, y desencadenando procesos de reparación de tejido. Todas estas respuestas van a demandar requerimientos energéticos, contribuyendo aún más al BEN (Ingvarsen y col., 2003).

La movilización lipídica excesiva se asocia a mayor incidencia de enfermedades en el periparto (Drackley, 1999). Valores altos de AGNE en las dos últimas semanas preparto está asociado a aumento en el riesgo de retención de placenta y desplazamiento de abomaso, además de una pérdida de 1,2 Kg de leche por día en los primeros 120 días de lactancia. Estos animales también presentan 3,6 veces más chances de ser descartados en los primeros 60 días (Seifi y col., 2011; Adewuyi y col., 2005). La caminata mejora el bienestar de los animales durante el periodo de transición. El ejercicio provoca que los AGNE se consuman en los músculos mediante β -oxidación, y este mecanismo ayudaría a disminuir los niveles sanguíneos de AGNE (Adewuyi y col., 2005).

Altas concentraciones de BHB (a partir de valores indicativos de cetosis subclínica) en lactancia temprana se asocia a un aumento en el riesgo de ocurrencia de desplazamiento de abomaso, y a una mayor duración y severidad de mastitis (Seifi y col., 2011; Adewuyi y col., 2005).

Las vacas que presentan baja concentración de calcemia (menos de 2,2 mmol/L) en las primeras 2 semanas posparto tienen mayor riesgo de presentar DA, y de ser descartadas en los primeros 60 DEL (Seifi y col., 2011). Según Ribeiro y col. (2013) los animales con hipocalcemia subclínica presentaron más casos de metritis que aquellos con normocalcemia.

Por otra parte, se ha demostrado que el EC tiene efecto sobre la incidencia de enfermedades en el posparto temprano. Las vacas gordas ($EC \geq 3,75$; escala 1-5) tienen mayor riesgo de desarrollar cetosis clínica (Seifi y col., 2011). En un estudio publicado por Ribeiro y col. en 2013 se determinó que las vacas con $EC < 3$ en la primera semana posparto presentan mayor prevalencia de enfermedades clínicas que aquellas vacas con EC entre 3 y 3,25 (45,1% vs 31,3%, respectivamente). Se ha demostrado también que el bajo EC 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 y col., 2004, 2013; Adrien y col., 2012). También la paridad tiene efecto diferencial en la incidencia de enfermedades y las vacas primíparas presentan más casos de metritis con relación a las múltiparas (Galvão y col., 2012).

Existen muy pocos trabajos, particularmente estudios epidemiológicos, que estimen la tasa de incidencia de las enfermedades ocurridas en el periparto. En el trabajo realizado por Ingvarsen y col. en 2003, en el cual analizaron datos de Finlandia y Estados Unidos, encontraron las siguientes incidencias: Cetosis 0,2 – 10%, Desplazamiento de abomaso 0,6 – 6,3%, Retención de placenta 3,1 – 12,4%, Metritis 2,2 – 43,8%, Mastitis 2,8 – 39%. En el ensayo de Seifi y col. en 2011 en el cual analizaron 849 vacas, encontraron que en los primeros 60 días de lactancia la incidencia de DA fue de 2,6%, siendo más alta si solo se toman en cuenta las primíparas (3,2%); el 3,6% de las vacas presentó cetosis clínica, siendo más alta si solo se toman en cuenta vacas de 3 o más lactancias (6,2%); el 4,6% de las vacas fueron descartadas (muertes o ventas) en los primeros 60 DEL. En cuanto a la hipocalcemia, alrededor el 50% de las vacas que paren en Estados Unidos sufren de hipocalcemia subclínica (Reinhardt y col., 2011; Chamberlin y col., 2013). La mayor parte de la bibliografía se basa en animales bajo condiciones de confinamiento, mientras que en Uruguay la producción lechera es principalmente con base pastoril. En 2002, Washburn y col. reportaron que las vacas en confinamiento presentan 1,8 veces más probabilidad de presentar mastitis, y 8 veces más probabilidad de ser descartadas por mastitis que vacas en pastoreo. Ribeiro y col. en 2013 determinaron la prevalencia de enfermedades del periparto en animales bajo alimentación de base pastoril, reportando que el 8,5% de las vacas presentó problemas al parto (distocia, retención de placenta, mellizos, mortinatos), el 5,3% tuvo metritis, el 4% sufrió patologías digestivas, el 35,4% presentó cetosis subclínica, y el 43,3% de las vacas tuvo hipocalcemia subclínica. En Uruguay se han presentado estudios recientes sobre enfermedades en el periparto en sistemas de base pastoril en Florida. En promedio, el 41% de las Vaca Masa presentó mastitis, el 14% cojeras, el 5% retención de placenta-metritis, y el 2% hipocalcemia clínica (caídas) (Pereira y col, 2017).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

A nivel nacional, el incremento en la producción de leche se ha basado principalmente en el aumento en la producción por vaca masa (DIEA, 2016). Para lograr ese nivel productivo es necesario aumentar la demanda de nutrientes de la dieta y de reservas corporales, lo cual frecuentemente lleva a problemas de salud e infertilidad (Mulligan y Doherty, 2008). La selección genética para lograr mayores producciones resulta en mayor estrés metabólico debido a que ese progreso a nivel de producción lechera, no fue acompañado de selección genética para mejorar la capacidad de consumo (Ingvarsen y col., 2003).

La ocurrencia de enfermedades durante el periodo de transición resulta en pérdida de producción de leche durante el transcurso de dicha enfermedad, y frecuentemente

durante toda la lactancia. A esta pérdida se deben sumar los costos por tratamiento, salario veterinario, y la pérdida de la remisión de leche durante el tratamiento. El uso irracional de antibióticos ha sido un problema que impacta fuertemente tanto en salud animal como en salud pública. Un BEN excesivo y marcada pérdida en la condición corporal también tiene efectos negativos sobre la salud (Drackley, 1999). En los últimos años se ha cambiado el paradigma sobre salud animal: antes su foco era tratamiento de enfermedades clínicas, ahora el foco está en la prevención de enfermedades. El manejo de la salud se ha definido como la promoción de salud, optimizando la productividad, previniendo enfermedades, reconociendo el bienestar animal, la seguridad alimenticia, la salud pública y la sustentabilidad ambiental (LeBlanc y col, 2006).

Como se mencionó anteriormente, no existen reportes en nuestro país que describan la interrelación entre el metabolismo, el sistema inmune y la enfermedad en vacas lecheras primíparas y multíparas. Esto es especialmente importante dado que las condiciones de producción de leche en sistemas pastoriles son diferentes a las de los sistemas de estabulación y que mucha de la información disponible se restringe a estos últimos. En este sentido, se hace necesaria la generación de información respecto a la inmunidad de vacas lecheras en sistemas pastoriles debido a que en cada sistema existen factores de riesgo inherentes a estos que pueden afectar de diferente manera.

La finalidad de este proyecto es evaluar el impacto de algunos factores de riesgo para salud de vacas lecheras en ordeño y determinar indicadores – especialmente del sistema inmune- que apoyen el desarrollo de la medicina preventiva de rodeos en nuestro país.

4. HIPÓTESIS

La hipótesis de trabajo es que la paridad es un factor que impacta en la salud de las vacas lecheras durante el periparto, reflejándose en indicadores metabólicos e inmunológicos.

5. OBJETIVO GENERAL

Esta tesis tuvo como objetivo caracterizar algunos parámetros del sistema inmune y metabólico de vacas lecheras primíparas y multíparas, durante el período de transición, y asociarlo con el estado de salud.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar los perfiles metabólicos e indicadores del sistema inmune (población de leucocitos, globulinas y haptoglobina) durante el período de transición en vacas sanas, con mastitis y con metritis.

- Evaluar si existe efecto de la paridad y el estado de salud sobre los perfiles metabólicos (AGNE, BHB, proteínas totales, albúmina, colesterol, urea).
- Estudiar el efecto del estado de salud sobre la producción y composición de la leche, así como la relación con el número de lactancia.
- Caracterizar el recuento leucocitario total, recuento leucocitario diferencial, la concentración de hemoglobina y los índices hematimétricos de vacas sanas en relación a los días posparto.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Animales y diseño experimental:

Este trabajo fue aprobado por la Comisión de Experimentación y Uso de Animales de la Facultad de Veterinaria (Expediente 111130-001530-13).

El trabajo se desarrolló con un diseño de cohorte prospectivo, en el cual, en cada establecimiento se trabajó con una población de animales que fue monitoreada desde el parto hasta el posparto. Los establecimientos lecheros donde se hizo este trabajo fueron designados como Tambo 1 y Tambo 2.

- Tambo 1:

El Tambo 1 era un tambo comercial con 400 vacas en ordeño, de la raza Holando, localizado en el Departamento de Rocha. El relevamiento se realizó entre los meses de agosto a octubre de 2014. Se seleccionaron 87 vacas a parir en el mes de agosto y setiembre, 27 primíparas (L1) y 60 multíparas (L2). En este establecimiento se registraron las enfermedades que ocurrieron en los primeros 30 días luego del parto. Los criterios son definidos en la siguiente sección.

- Tambo 2:

El segundo relevamiento se realizó entre los meses de Febrero y Junio de 2015, en el Campo Experimental N° 2, de la Facultad de Veterinaria. Se utilizaron 47 vacas, de las cuales 26 eran L1 y 21, L2. La raza de las vacas era Holando (n=28), Jersey (n=8) y sus cruza (n=11).

La alimentación durante el parto consistió en una mezcla de 8 kg de materia seca (MS) de ensilaje de maíz y 3 kgMS de cascarilla de soja por vaca y por día. Contaban con fardos de paja *ad libitum*. También en los potreros parto, las vacas tenían acceso a agua y sombra, no accediendo al pastoreo. No se suplementaban sales aniónicas. Tanto L1 como L2, se manejaron como un lote único. La fecha promedio de partos fue el 11/4/2015±22 días.

La alimentación de las vacas lecheras, luego del parto y durante la lactancia se presenta en la Cuadro I. La pastura fue a base de Raigrás (*Lolium perenne*) y Avena.

Cuadro I. Alimentación de las vacas durante la lactancia.

Mes	kgMS/Vaca/día			Total Ofrecido (kgMS/vaca/día)
	Cascarilla soja	Ensilaje de planta entera de maíz	Pastura	
Febrero	5	2	11	18
Marzo	5	11	2	18
Abril	5	9	5	19
Mayo	6	11	2	19
Junio	6	11	2	19

Desde los 30 días antes del parto se realizó la evaluación del estado corporal utilizando la escala de Edmonson y col. (1989), cada 15 días. Luego del parto la evaluación se realizó de forma semanal. Esos mismos días se extrajo sangre de la vena coccígea. La extracción de sangre, evaluación de estado corporal y seguimiento de los animales se realizó hasta los 60 días postparto.

Mensualmente hasta el cuarto mes de lactancia, se realizaron controles lecheros para medir la producción de leche de cada vaca, utilizando medidor de marca Waikato. Del medidor se extrajo una muestra representativa de leche del ordeño de la mañana, y dichas muestras fueron remitidas al laboratorio COLAVECO. Allí se determinó la concentración de proteína, grasa y lactosa mediante el método de absorción de radiación infrarroja cercana, y el recuento de células somáticas (RCS) se determinó mediante citometría de flujo. Estos análisis se realizaron hasta el cuarto mes de lactancia. Con los resultados de porcentaje de grasa de la leche se determinó la leche corregida por grasa al 4%.

7.2. *Determinaciones*

Se extrajeron dos muestras de sangre de cada vaca en cada día de muestreo, utilizando una aguja descartable por animal. Las mismas fueron obtenidas en tubos con vacío, uno conteniendo anticoagulante EDTA y otro sin anticoagulante. La sangre entera fue remitida refrigerada, el mismo día de la extracción, al Laboratorio de Análisis Clínicos de la Facultad de Veterinaria, en Montevideo, para realizar el hemograma completo, incluyendo recuento leucocitario total (RLT) y diferencial (RLD), recuento de glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito y recuento de plaquetas. La sangre sin anticoagulante fue centrifugada a 3000 rpm durante 10 minutos. Las muestras de suero fueron almacenadas a -20°C para realizar posteriormente las determinaciones.

El recuento celular, la dosificación de la hemoglobina y los índices hematimétricos, fueron realizados en el contador hematológico Huma Count (Human GmbH, Wiesbaden-Germany). La clasificación de los leucocitos, se realizó en forma manual, en un frotis teñido por la técnica de May Grünwald – Giemsa.

La concentración de los metabolitos se analizó en un Espectrofotómetro Vitalab Selectra 2, realizando los análisis en el Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal de la Facultad de Veterinaria. Los metabolitos, la metodología, reactivos utilizados y coeficiente de variación inter-ensayo para cada parámetro, se detallan a continuación. Betahidroxibutirato (BHB): reactivo Ranbut, Randox Laboratories Limited, método: cinético enzimático, D-3-Hydroxybutyrate, límite de detección: 0,1 mmol/L, CV: 6,8%. Ácidos grasos no esterificados (AGNE): reactivo NEFA -HR 2, Wako; método: enzimático colorimétrico ACS ACOD; límite de detección: 0,01 mmol/L, CV: 5,3%. Albúmina, reactivo: Albúmina AA, Wiener Lab.; método: BCG; límite de detección: 0,00 g/L, CV: 2,2%. Proteínas totales, reactivo: Proteínas totales AA, Wiener Lab.; método: Biuret; límite de detección: 0,00 g/L, CV: 2,3%. Colesterol,

reactivo: Colestat enzimático AA líquido, Wiener Lab.; método: CHOD-PAP; límite de detección: 0.00 g/L, CV: 5,7%. Urea, reactivo: Urea UV, AA líquido, Wiener Lab.; método: GIDH UV; límite de detección: 0,63 mmol/L, CV: 5,9%. Calcio, reactivo: Calcio-color Arsenazo III AA, Wiener Lab, Argentina, método: Arsenazo III, Límite de detección 0,6 mmol/L, CV: 3,8%.

La haptoglobina se analizó en muestras de suero sanguíneo, utilizando Haptoglobin kit, Tridelta Development Ltd.; método: colorimétrico; Lector de microplaca Thermo Electron Corporation, Multiscan EX; sensibilidad analítica: 0,005 mg/mL.

7.3. *Criterio para la definición de enfermedades*

Durante el período de evaluación en el Tambo 1 y el Tambo 2, se registraron los casos clínicos que ocurrieron de mastitis, retención de placenta/metritis, hipocalcemia clínica o cualquier otro problema de salud diagnosticado por los médicos veterinarios que visitaban semanalmente el establecimiento. La mastitis clínica se definió como la presencia de leche anormal (presencia de coágulos, leche acuosa, alteración del color) acompañada o no de signos inflamatorios de la glándula mamaria (Duffield y col, 1999) detectada por el personal que realizaba el ordeño mediante la evaluación de los primeros chorros de leche. La retención de placenta se definió como la falla en la expulsión de la placenta a las 24 horas luego del parto. La metritis fue caracterizada por la presencia de una descarga vaginal, fétida, acuosa y temperatura rectal $>39,5^{\circ}\text{C}$ (Galvão y col., 2009). La hipocalcemia clínica fue definida como la presencia de una vaca en decúbito entre las 72 horas luego del parto, que podía presentar anorexia, temblores, flacidez muscular y que tenía buena respuesta a la administración de calcio intravenoso (Duffield y col, 1999).

Aquellos animales que presentaron alguna de estas patologías clínicas, antes descriptas, se los clasificó como enfermos.

Se determinó la ocurrencia de cetosis subclínica en el posparto, teniendo en cuenta la concentración de BHB en el posparto. De acuerdo con esto, se clasificaron las vacas en dos grupos: con cetosis subclínica y sin cetosis subclínica. Se consideró cetosis subclínica a aquellas vacas que presentaron una o más muestras de suero con concentraciones $\geq 1,2$ mmol/L de BHB durante el posparto (hasta los 60 dpp). Se determinó luego el efecto de la cetosis subclínica sobre la producción y composición de leche.

7.4. *Análisis estadístico*

Los resultados de la ocurrencia de enfermedad del Tambo 1 y Tambo 2 se presentan de forma descriptiva.

La producción de leche, composición de la leche, estado corporal, concentración de proteínas totales, albúmina, globulinas, urea, NEFA, BHB y colesterol fueron analizados con el paquete estadístico SAS (v. 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC), usando un análisis de medidas repetidas en el tiempo, mediante el procedimiento MIXED, incluyendo al animal como efecto aleatorio. El modelo incluyó el efecto de la Paridad (L1 y L2), el tipo de enfermedad (0=sana, 1=mastitis clínica, 2= retención de placenta + metritis), el período (semana/mes respecto al parto), e interacción de los efectos fijos.

Para analizar el efecto de la enfermedad sobre la concentración de haptoglobina se clasificaron las vacas en cuatro grupos: 1. vacas sin eventos clínicos (sanas), 2. vacas con mastitis clínica, 3. vacas con mastitis subclínicas (por RCS en leche > 200.000 cél/mL) y 4. Vacas con metritis.

Para el análisis de los parámetros sanguíneos RLT y RLD, recuento de glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito y recuento de plaquetas, sólo se tomaron en cuenta los animales sanos. Los resultados se agruparon de acuerdo con el parto, en 3 períodos. El período preparto abarcó determinaciones desde el día -30 hasta el día del parto; el período “primer mes posparto” abarcó determinaciones realizadas durante el primer mes luego del parto; y el período “segundo mes posparto” abarcó determinaciones realizadas durante el segundo mes posparto. Además, en el modelo sólo se determinó el efecto de estos períodos sobre los distintos parámetros.

Se consideraron diferencias significativas cuando el valor de p fue menor a 0,05, y tendencia cuando el valor de p se encontraba entre 0,05 y 0,10.

8. RESULTADOS

8.1. Incidencia acumulada de enfermedades

El 14,9% de las vacas del Tambo 1 enfermaron en el primer mes posparto, mientras que en el Tambo 2 se enfermaron el 29,8% de las vacas durante los primeros 60 días posparto. La incidencia de las enfermedades se presenta en los cuadros II y III.

Cuadro II. Incidencia de enfermedades de vacas del Tambo 1 durante los primeros 30 días posparto.

Categoría	L1-primíparas	L2-multíparas
Mastitis clínica	7,4% (2/27)	13,3% (8/60)
Metritis	11,1% (3/27)	0% (0/60)
Total de enfermas	18,5% (5/27)	13,3% (8/60)

Cuadro III. Incidencia de enfermedades de vacas del Tambo 2 durante los primeros 60 días posparto.

Categoría	L1-primíparas	L2-multíparas
Mastitis clínica	34,6% (9/26)	9,5% (2/21)
Metritis	3,8% (1/26)	9,5% (2/21)
Total de enfermas	38,4% (10/26)	19,0% (4/21)

La incidencia de mastitis clínica en Tambo 1 fue de 11,5%, mientras que en Tambo 2, fue de 23,4%. Además, la incidencia de metritis en Tambo 1 fue de 3,4%, y en el Tambo 2 fue de 6,3%.

8.2. Producción leche corregida por grasa al 4%

La producción de leche corregida por grasa al 4% estuvo afectada por el número de lactancia ($p=0,03$). En los primeros cuatros meses de lactancia el promedio fue de $19,6 \pm 1,24$ kg/día para primíparas y $23,9 \pm 1,24$ kg/día para las vacas multíparas.

El tipo de enfermedad no afectó la producción de leche corregida por grasa ($p=0.38$) y tampoco hubo interacción entre el periodo y el tipo de enfermedad ($p=0.38$, Fig. 1).

Los días posparto, afectaron la producción de leche ($p<0,001$), dónde la mayor producción se registró en el segundo mes de lactancia (mes 1: 21,0L, mes 2: 24,7L, mes 3: 19,8L, mes 4: 21,5L).

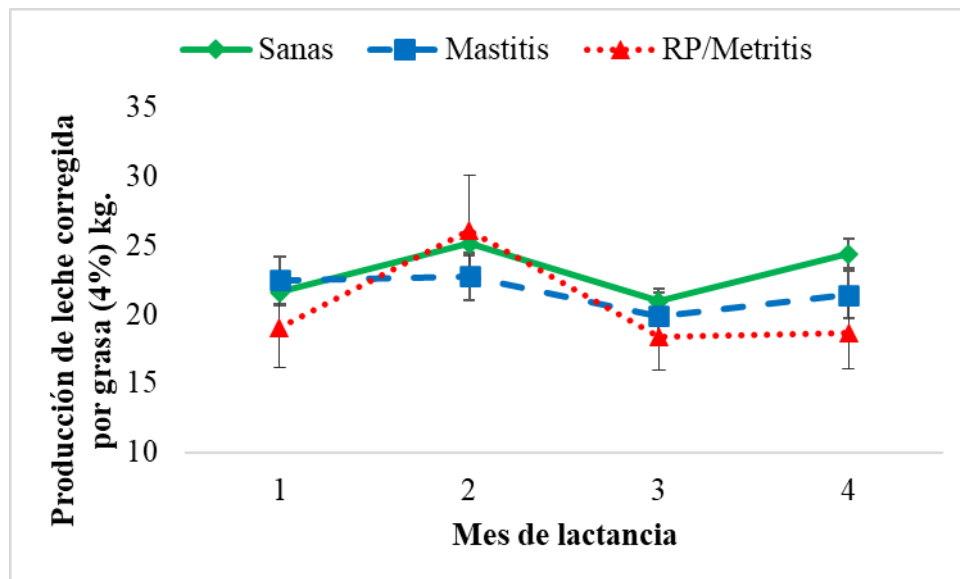


Figura 1. Producción de leche corregida por grasa al 4% (Kg/d).

8.3. Composición de leche: porcentaje de grasa, proteína y lactosa

El porcentaje de grasa en leche se vio afectado por la paridad, determinando que las vacas L2 tuvieron mayor porcentaje de grasa que las L1 ($4.73 \pm 0.2\%$ vs $4.06 \pm 0.1\%$, $p=0.02$, Cuadro IV). Se observó, además, un efecto del período sobre la composición de grasa en leche, siendo la mayor producción en el cuarto mes de lactancia ($p=0.04$). En cuanto al estado de salud, se observó un efecto de la interacción tipo de enfermedad y paridad ($p=0.01$). Las vacas multíparas enfermas con mastitis, produjeron leche con mayor porcentaje de grasa que las multíparas sanas (5.3 ± 0.4 vs 4.2 ± 0.2 , respectivamente).

Cuadro IV. Test F, efectos fijos incluidos en el modelo para las mediciones de los parámetros de la leche: número de lactancia (NL), TENF (tipo de enfermedad), y MES (mes posparto) y las interacciones entre los mismos.

	NL	TENF	MES	NL*TENF	NL*MES	TENF*MES	RAZA
% LACTOSA	0.03	0.03	<.0001	0.03	0.05	0.27	0.52
% GRASA	0.02	0.15	0.09	0.01	0.48	0.88	0.08
% PROTEÍNA	0.01	0.01	<.0001	0.05	0.78	0.61	0.01
Recuento de Células Somáticas	0.03	<.0001	0.53	0.02	0.02	0.30	0.08

En cuanto al porcentaje de lactosa en leche, hubo un efecto del número de lactancia sobre la concentración. Las vacas primíparas tuvieron mayor concentración de lactosa en relación a las multíparas ($5.1 \pm 0.1\%$ vs $5.0 \pm 0.1\%$). Además, se observó un efecto del

estado de salud. Las vacas sanas presentaron mayor concentración de lactosa en leche en comparación con las vacas enfermas ($5,13 \pm 0,03\%$ vs $5,01 \pm 0,05\%$, $p=0,03$). La lactosa aumentó con los meses respecto al parto ($p<0,0002$), presentando la mayor concentración en el cuarto mes posparto ($5,2 \pm 0,04\%$). El menor porcentaje se registró en el primer mes posparto ($4,9 \pm 0,04\%$).

Cuadro V. Porcentaje de proteína, grasa y lactosa de la leche, para vacas que tuvieron o no, mastitis clínica.

	MES DE LACTANCIA							
	1		2		3		4	
	Sanas	Mastitis	Sanas	Mastitis	Sanas	Mastitis	Sanas	Mastitis
% PROTEÍNA	$3.38 \pm 0.1b$	$3.85 \pm 0.1a$	$3.38 \pm 0.1a$	$3.42 \pm 0.1a$	$3.05 \pm 0.1a$	$3.39 \pm 0.1a$	$3.35 \pm 0.1a$	$3.59 \pm 0.1a$
% GRASA	$4.09 \pm 0.2a$	$4.56 \pm 0.3a$	$3.91 \pm 0.2a$	$4.22 \pm 0.3a$	$4.18 \pm 0.2a$	$4.68 \pm 0.3a$	$4.64 \pm 0.2a$	$4.86 \pm 0.3a$
% LACTOSA	$5.00 \pm 0.1a$	$4.84 \pm 0.1a$	$5.11 \pm 0.1a$	$5.06 \pm 0.1a$	$5.16 \pm 0.1a$	$4.99 \pm 0.1a$	$5.27 \pm 0.1a$	$5.12 \pm 0.1a$

Letras diferentes indican diferencia significativa en la composición, dentro de cada mes, para vacas con y sin mastitis, respectivamente.

Respecto a la proteína de la leche, hubo un efecto de la paridad, siendo que las vacas las vacas L2 presentaron mayor concentración de proteína en leche, comparadas con L1 (3.5 ± 0.1 vs $3.2 \pm 0.1\%$, respectivamente, $p=0,005$). Por otra parte, las vacas sanas produjeron leche con menor concentración de proteína que las vacas enfermas (Cuadro IV). Hubo, además, un efecto del período sobre el porcentaje de proteína en leche (Cuadro IV), siendo en el tercer mes de lactancia en el cual la concentración de proteína fue menor. En la tabla 4 se presentan las medias para la composición de la leche, mes a mes, para vacas sanas y vacas que tuvieron mastitis clínica.

8.4. Recuento de células somáticas

Hubo efecto de la paridad sobre el recuento de células somáticas. Las vacas L2 tuvieron mayor RCS (5.1 ± 0.10 Log10 vs 4.8 ± 0.07 Log 10). Además, las vacas que tuvieron mastitis tuvieron mayor RCS en comparación a las vacas sanas (Cuadro IV).

8.5. Estado corporal

No hubo efecto de la paridad ($p=0,08$) ni del tipo de enfermedad sobre el estado corporal. El período afectó el EC ($p<0,0001$): el mayor EC se observó durante el preparto, y luego descendió, mientras que el menor EC se observó en la sexta semana de lactancia con relación al EC preparto. En la Fig. 2 se presenta la evolución del EC en vacas sanas y enfermas con relación a los días posparto.

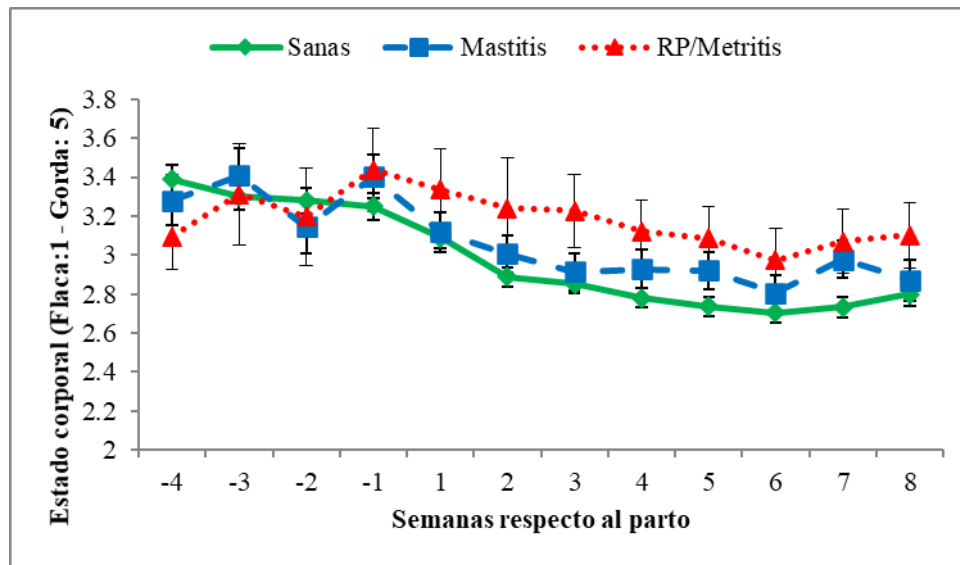


Figura 2. Evolución del estado corporal de vacas sanas y vacas enfermas (mastitis y retención de placenta y/o metritis).

8.6. Metabolitos sanguíneos

8.6.1. Ácidos grasos no esterificados

La concentración de ácidos grasos no esterificados estuvo afectada solamente por el tipo de enfermedad (Cuadro VI). Las vacas sanas presentaron mayor concentración en relación a las vacas que tuvieron retención de placenta y/o metritis (0.50 ± 0.01 mmol/L vs 0.27 ± 0.07 mmol/L, respectivamente).

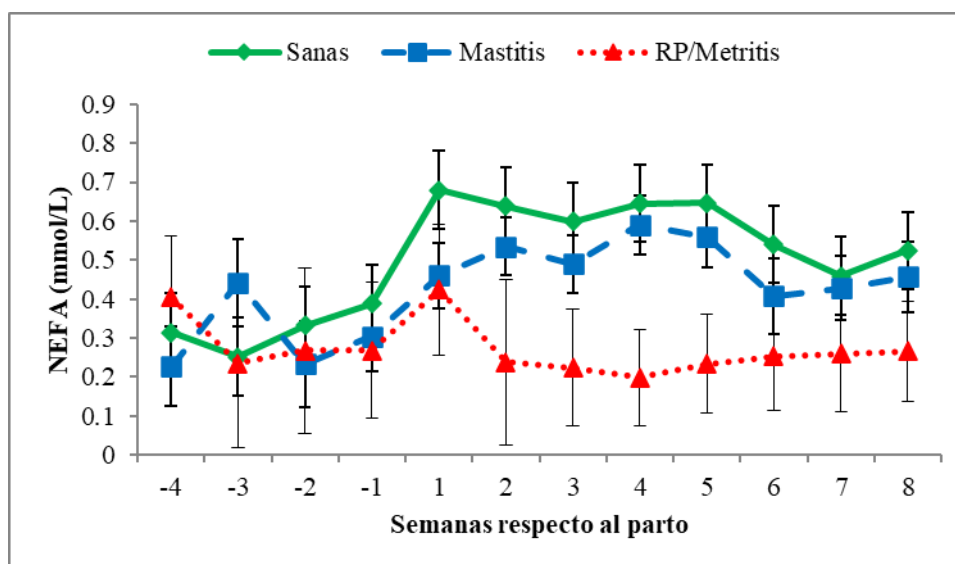


Figura 3. Concentración de ácidos grasos no esterificados (NEFA) en relación a las semanas respecto al parto para vacas sanas, con mastitis y con retención de placenta (RP) y/o metritis.

Cuadro VI. Test F, efectos fijos incluidos en el modelo para los metabolitos y el estado corporal: número de lactancia (NL), TENF (tipo de enfermedad), y SEMPP (semana posparto) y las interacciones entre los mismos.

Variable	NL	TENF	NL*TENF	SEMPP	NL*SEMPP	TENF*SEMPP
Proteínas totales	ns	0.04	0.04	0.06	0.06	0.00
Globulinas	ns	0.08	0.03	0.02	0.09	0.01
Albúmina	0.08	0.02	ns	ns	ns	ns
Urea	ns	0.06	ns	0.001	ns	0.008
NEFA	ns	0.01	ns	ns	ns	ns
BHB	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Colesterol	ns	ns	ns	<0,0001	ns	ns
Estado corporal	0.08	0.09	0.06	<0,0001	ns	ns

ns= no significativo.

8.6.2. β - Hidroxibutirato

Respecto a la concentración de BHB, no hubo efecto significativo de las variables incluidos en el modelo (Cuadro VI), ni de las interacciones de los efectos fijos. En la figura 4 se presenta la evolución de la concentración de BHB en relación a las semanas posparto.

Las medias de la concentración de BHB para vacas sanas fue 0.56 ± 0.03 mmol/L, para vacas que presentaron mastitis durante el periodo evaluado fue de 0.49 ± 0.07 mmol/L y para aquellas vacas que presentaron metritis posparto fue de 0.47 ± 0.13 mmol/L.

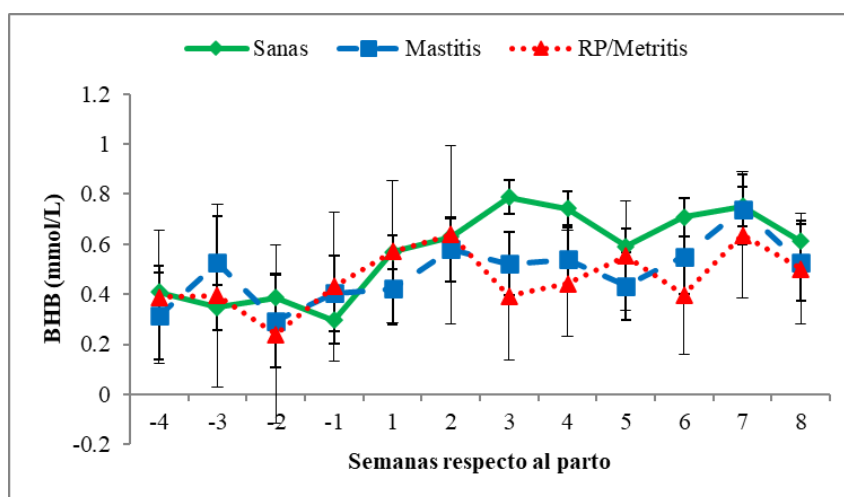


Figura 4. Concentración de beta-hidroxibutirato (BHB) en relación a las semanas respecto al parto para vacas sanas, con mastitis y con retención de placenta (RP) y/o metritis.

8.6.3. Proteínas totales y globulinas

La concentración de proteínas totales y de globulinas no estuvo afectada por el número de lactancia (Cuadro VI). Hubo, en cambio, efecto del tipo de enfermedad sobre la concentración de proteínas totales y una tendencia del mismo efecto, sobre la concentración de globulinas. Además, la concentración de ambos metabolitos estuvo afectada por las semanas respecto al parto (en caso de proteínas totales, hubo una tendencia de $p=0.06$), siendo los valores más bajos en los días entorno al parto. A su vez, hubo una interacción entre el tipo de enfermedad y las semanas posparto, es decir, si bien hubo un descenso de ambos parámetros, las vacas que tuvieron retención de placenta y/o metritis tuvieron un descenso marcado, ya a las 3 semanas previo al parto (Fig. 5).

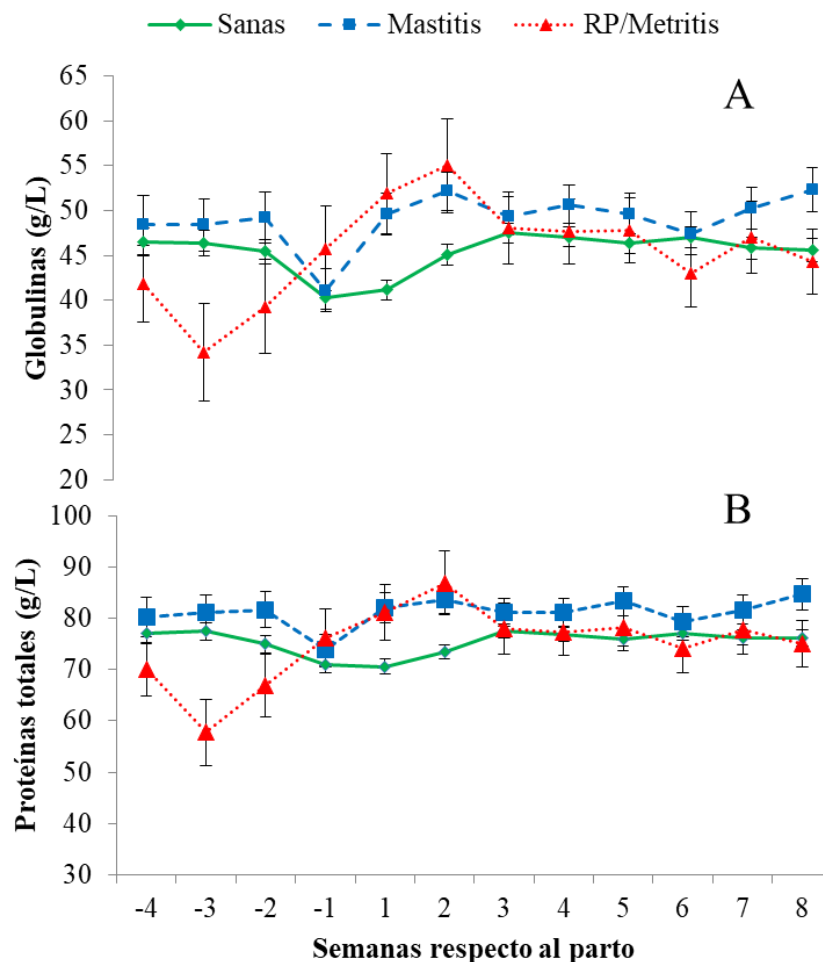


Figura 5. Concentración de globulinas (A) y proteínas totales (B), en relación a las semanas respecto al parto para vacas sanas, con mastitis y con retención de placenta (RP) y/o metritis.

8.6.4. Albúmina

La concentración de la albúmina sérica no tuvo variaciones respecto a las semanas posparto (Cuadro 6). El número de la lactancia tendió afectar la concentración de albúmina siendo mayor en vacas multíparas, respecto a vacas primíparas. Además, las vacas con mastitis presentaron mayor concentración que las vacas sanas y con RP/metritis ($32,3 \pm 0.8$ g/L en vacas que tuvieron mastitis, 30 ± 0.4 g/L en vacas sanas y 29.3 ± 1.3 g/L para vacas con RP/metritis).

8.6.5. Urea

La concentración de urea sérica estuvo afectada por las semanas posparto, pero no hubo efecto del número de lactancia. También, hubo una tendencia a que la concentración de urea en vacas que tuvieron mastitis haya sido mayor a las que tuvieron RP/metritis, pero fue similar a la de vacas sanas.

Hubo un incremento de la urea desde la semana 2 antes del parto a la semana 1. Luego los valores se mantuvieron, llegando a concentraciones similares a las reportadas en el preparto, y luego vuelve a aumentar en la semana 7. En las vacas sanas hubo un incremento en la concentración de urea que fue máximo a la semana luego del parto y luego en la segunda semana ya vuelve a caer y se mantiene la concentración sin variaciones hasta las 8 semanas luego del parto. En las vacas enfermas también hubo un incremento en la concentración de urea inmediatamente luego del parto (semana 1 y 2), con relación a la semana 2 antes de parto (Fig. 6).

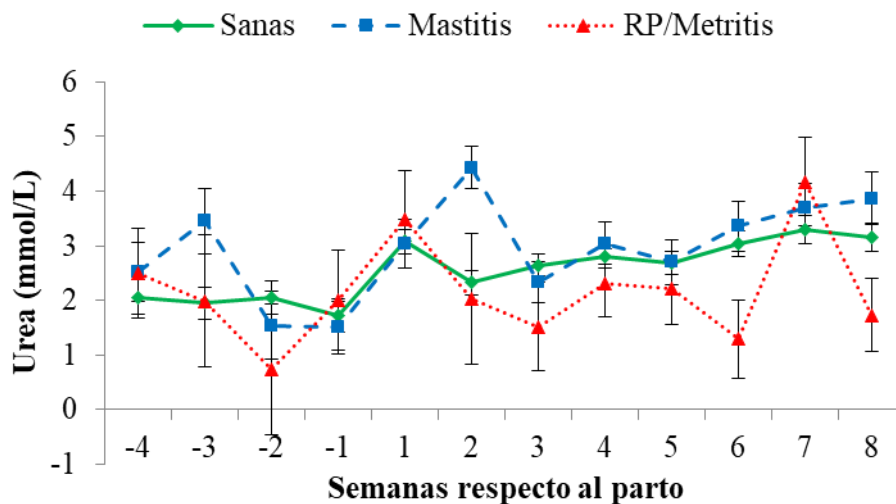


Figura 6. Concentración de urea en suero sanguíneo, en relación a las semanas respecto al parto para vacas sanas, con mastitis y con retención de placenta (RP) y/o metritis.

8.6.6. Colesterol sérico

La concentración de colesterol solamente estuvo afectada por la semana respecto al parto. Los demás efectos no fueron significativos. En la figura 7 se presenta la evolución del colesterol, para cada categoría, en las semanas respecto al parto.

En el preparto desciende la concentración de colesterol hasta llegar a la semana 1 posparto donde se observó el menor valor. Luego aumentó en el posparto, existiendo una diferencia significativa a partir de la tercera semana donde se diferenció de la concentración en el preparto.

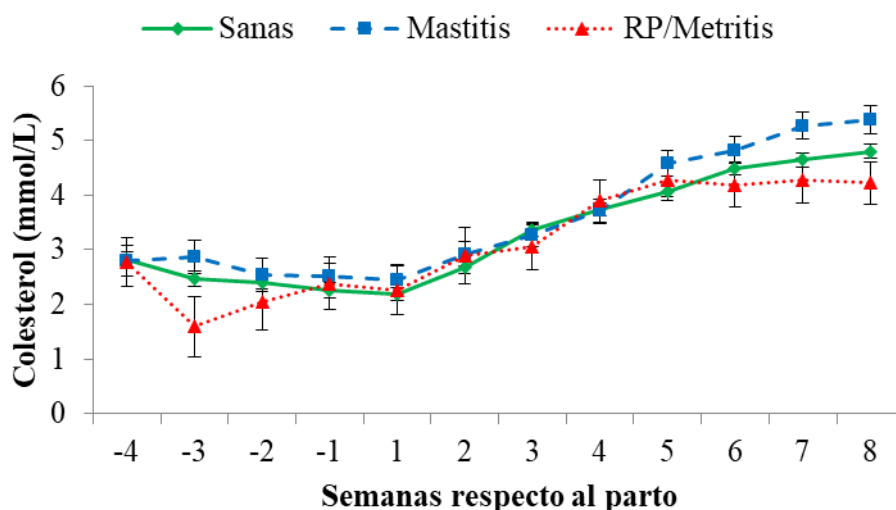


Figura 7. Concentración de globulinas (A) y proteínas totales (B), en relación a las semanas respecto al parto para vacas sanas, con mastitis y con retención de placenta (RP) y/o metritis.

8.6.7. Calcio sanguíneo

No se encontraron diferencias de calcemia entre animales L1 y L2 ($p=0.30$). Tampoco hubo efecto de los días posparto ($p=0.46$), ni del tipo de enfermedad que las vacas tuvieron ($p=0.23$). La evolución de la concentración de calcio sanguíneo de todas las vacas evaluadas del Tambo 2, se presenta en la Fig. 8.

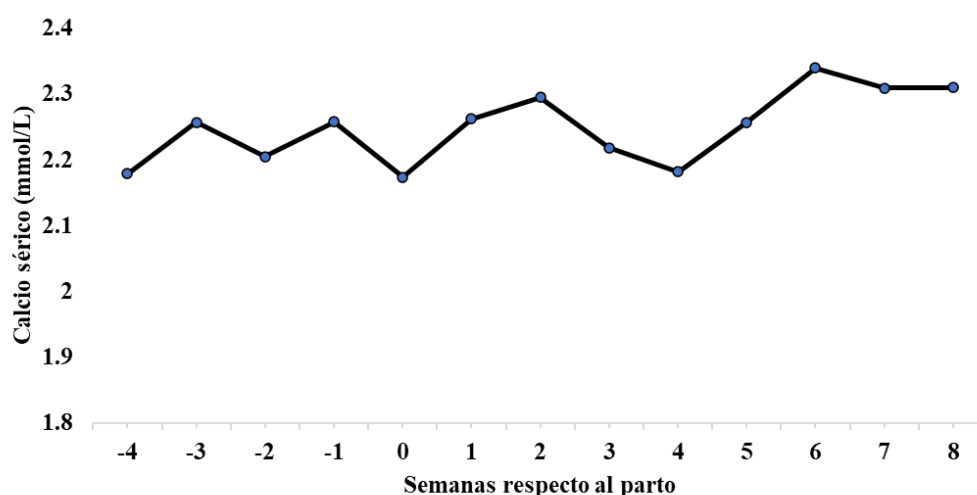


Figura 8. Concentración de calcio sanguíneo para todas las vacas monitoreadas en relación a los días posparto.

8.7. Haptoglobina

La concentración de Hp no estuvo afectada por la paridad ($p=0,43$), pero las vacas enfermas tendieron a presentar mayor concentración de haptoglobina que las sanas ($p=0,06$).

La concentración promedio de Hp de acuerdo a la salud de las vacas se presenta en el cuadro VII.

Cuadro VII. Concentración de haptoglobina en primera semana posparto en vacas sanas y enfermas.

	Hp (mg/mL) $\pm$ error estándar
Vacas sanas	$0,33 \pm 0,05c$
Vacas con mastitis clínica	$0,61 \pm 0,09b$
Vacas con metritis	$1,66 \pm 0,19a$
Vacas con mastitis subclínica	$1,44 \pm 1,14a$

^{ab} indican diferencias significativas entre los distintos grupos ($p<0,05$)

Hubo efecto de las semanas respecto al parto ($p<0,0001$), observándose claramente un aumento de haptoglobina en la primera semana posparto.

Además, hubo interacción entre la enfermedad y las semanas posparto ($p<0,001$), la cual se presenta en la figura 9. Se observa que en la semana inmediatamente posterior al parto hubo un aumento de haptoglobina en todos los animales que enfermaron. Pero en esa semana, las vacas que tuvieron metritis ($1,66 \pm 0,19$ mg/mL) y mastitis subclínica ($1,44 \pm 0,14$ mg/mL) alcanzaron la mayor concentración en comparación con las vacas sanas ($0,33 \pm 0,05$ mg/mL) y las que tuvieron mastitis clínica ($0,61 \pm 0,1$ mg/mL). No se observaron diferencias significativas entre periodos en vacas sanas.

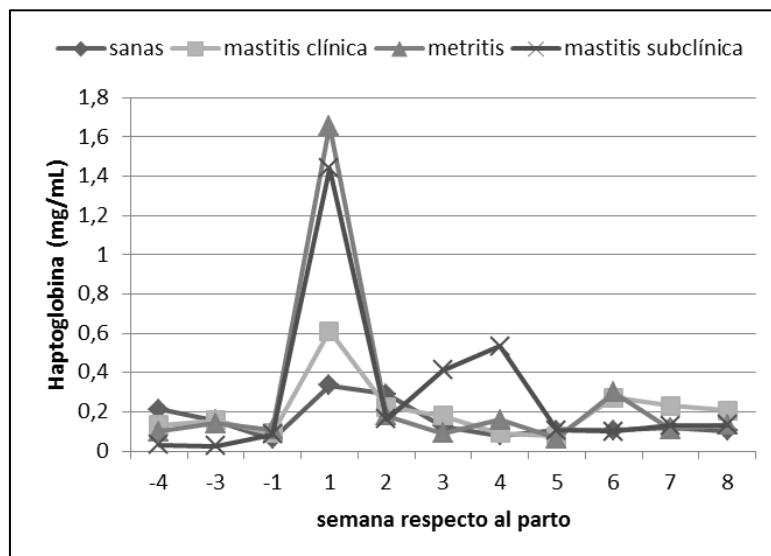


Figura 9. Concentración de haptoglobina para los distintos subgrupos de vacas de acuerdo con la salud.

Los coeficientes de correlación entre la concentración de haptoglobina y albúmina, para las vacas sanas y enfermas, se observan en la tabla VIII. Se encontró una correlación significativa y negativa entre haptoglobina y albúmina.

Cuadro VIII. Coeficientes de correlación de Pearson entre haptoglobina (Hp) y Albúmina (Alb).

	Hp/Alb
Coeficiente de correlación de Pearson	-0,51
Significancia	<0,0001

8.8. Recuento de glóbulos rojos, blancos, hemoglobina, índices hematimétricos y clasificación de los leucocitos.

En el cuadro IX, se presentan los valores medios de los parámetros hematológicos para vacas sanas.

Cuadro IX. Valores medios de los parámetros hematológicos de vacas sanas.

Parámetro		Preparto	Primer mes posparto	Segundo mes posparto	P
Glóbulos Blancos (x10 ⁹ /L)		10,73 ± 1,43 a	8,40 ± 1,40 b	8,99 ± 1,50 ab	0,05
Neutrófilos (x10 ⁹ /L)		4,67 ± 0,6	2,69 ± 0,7	3,34 ± 2,0	0,11
Linfocitos (x10 ⁹ /L)		4,87 ± 1,2	4,37 ± 1,2	2,72 ± 2,4	NS
Monocitos (x10 ⁹ /L)		0,19 ± 0,04	0,29 ± 0,05	0,26 ± 0,14	NS
Neutrófilos (%)		48,6 ± 4,7	34,6 ± 5,3	35,9 ± 15,8	NS
Linfocitos (%)		40,6 ± 4,9	50,7 ± 5,3	38,8 ± 15,8	NS
Monocitos (%)		2,04 ± 0,7	4,39 ± 0,8	2,67 ± 2,5	NS
Glóbulos Rojos (x10 ¹² /L)		6,67 ± 0,26	6,29 ± 0,26	5,75 ± 0,30	0,07
Hematocrito (%)		33,8 ± 0,88 a	30,7 ± 0,88 b	26,4 ± 1,05 c	0,0002
Hemoglobina (g/dL)		11,7 ± 0,28 a	10,7 ± 0,28 a	9,6 ± 0,33 b	0,0007
Plaquetas (x10 ⁹ /L)		188,7 ± 33,1	294,7 ± 36,3	181,3 ± 40,3	NS

ab indican diferencias significativas entre columnas

El recuento de glóbulos blancos fue diferente entre períodos (p=0,05): durante el primer mes posparto las vacas presentaron menor recuento de glóbulos blancos en relación con el preparto. Se observó también una tendencia (p=0,11) a que en el primer mes posparto disminuyera el recuento de neutrófilos.

En cuanto a la línea roja, se observó una tendencia (p=0,07) a que en el segundo periodo disminuyera el recuento de eritrocitos. Además, en el segundo mes posparto, hay un descenso del hematocrito (p=0,0002), y de la hemoglobina (p=0,0007)

El conteo de plaquetas no estuvo afectado por el período.

9. DISCUSIÓN

Del total de vacas incluidas en este trabajo, el 20% presentó enfermedad clínica en los primeros dos meses posparto (14,9% en Tambo 1, 29,8% en Tambo 2), siendo la mastitis la enfermedad clínica más frecuente (Tambo 1 11,5%, Tambo 2 23,4%). Si bien ambos tambos presentaban características diferentes, coincidieron ampliamente en ese aspecto y también coinciden con los datos presentados por Pereira y col. (2017) en el cual la mastitis es la enfermedad más frecuente, con un 40% de las vacas masa afectadas. En la revisión de Ingvarlsen y col. (2003) la mastitis presentó una incidencia variable entre 2,8 y 39%. Además de la incidencia, hubiera sido interesante haber tenido identificados los agentes causantes de los casos de mastitis para poder entender la epidemiología de esta enfermedad en los tambos en seguimiento. La identificación de los agentes podría ayudar a entender cuál fue la fuente de infección de las vacas enfermas y por lo tanto saber cuáles serían las formas de prevenir esta enfermedad (DeVliegheer y col., 2018). Lo interesante fue que, en ambos tambos, hubo un porcentaje importante de vacas enfermas en los primeros días de la lactancia y es justamente el primer mes posparto donde es esperable tener la mayor proporción de vacas con mastitis clínica (Barkema y col., 1998). Respecto a la categoría animal y la mastitis clínica, en ambos tambos hubo mayor proporción de vacas primíparas con mastitis que vacas multíparas. Barkema y col (1998) reportaron que las vacas primíparas si bien presentaron menor incidencia de casos clínicos, cuando se presentaron, ocurrieron mayormente en los primeros 14 días de lactancia. En ese mismo trabajo, la prevalencia para vacas primíparas a los 14 días posparto fue de 30%, mientras que las vacas multíparas presentaron una prevalencia del 13%.

Respecto a las enfermedades uterinas, específicamente metritis, hubo una incidencia de 3,4% y 6,3%, para el Tambo 1 y 2, respectivamente. En relación con otros trabajos, la metritis tiene una incidencia muy variable de entre 2,2 y 43,8% (Ingvarlsen y col., 2003). Daros y col. (2017) realizaron una investigación sobre vacas en pastoreo, obteniendo una incidencia de metritis del 11,2%. Dubuc y col (2010) en sistemas estabulados reportan una incidencia de metritis del 17,6%. Estos últimos autores estudiaron los factores de riesgo para las enfermedades uterinas. Dentro de estos factores, la concentración alta de AGNE en el preparto, aumentó la tasa de riesgo para metritis, estableciendo que las vacas que, a los 7 días previos al parto, presentaban una concentración $\geq 0,6$ mmol/L tuvieron 1,6 veces más riesgo de presentar metritis. En el presente trabajo la concentración de AGNE en el preparto, evaluada entorno a los 15 días previos al parto, entre vacas sanas y vacas enfermas, no tuvo diferencias significativas y la concentración promedio fue menor a 0,6 mmol/L (Sanas: $0,49 \pm 0,03$ vs Enfermas: $0,52 \pm 0,05$ mmol/L). Si bien, hubo pocos casos de metritis, este hallazgo no concuerda con lo reportado en la bibliografía, respecto al impacto que tiene la movilización de reservas sobre la salud de los animales. Esto es porque no se encontró una asociación entre la concentración de AGNE y la enfermedad clínica, ni entre BHB y la enfermedad. Es sabido, de acuerdo a la bibliografía internacional, que los animales con altas concentraciones de AGNE así como de BHB en sangre, son más propensos a

enfermar debido a que su sistema inmune se encuentra alterado (Adewuyi y col., 2005; Duffield y LeBlanc, 2009; Duffield y col., 2009).

En este trabajo, los animales enfermos tendieron a presentar mayor estado corporal promedio que las vacas sanas. Existe mucha información sobre los problemas metabólicos que produce un exceso de EC en el parto. En la revisión de Roche y col. de 2009, se indica que existe relación entre el RCS y el EC: a mayor EC al parto, mayor RCS. La teoría es que los animales de mayor EC al parto, presentan cetosis más frecuentemente, y la cetosis predispone a la mastitis. Sin embargo, en este estudio las vacas sanas presentaron mayor concentración AGNE y no las vacas enfermas. Tampoco se encontró un efecto de la enfermedad sobre la concentración de BHB, por lo tanto, no se pudo confirmar que la cetosis fue predisponente para la ocurrencia de estas enfermedades. Por otro lado, en cuanto a metritis, Daros y col. (2017) encontraron que los animales con menor EC presentaban mayor incidencia de dicha enfermedad. Seguramente los resultados en este ensayo fueron diferentes debido a que la mayor parte de animales enfermos se debieron a mastitis.

Las diferencias encontradas en la movilización de reservas, entre vacas sanas y enfermas, pueden deberse al EC al parto. Existe mucha información sobre los problemas metabólicos que se producen, principalmente por el exceso de EC en el parto y al parto. Roche y col. (2009) establecieron que aquellas vacas que paren con $EC > 3,5$ tienen el doble de riesgo de presentar cetosis, en relación con una vaca que pare con 3,25. En este trabajo, un mes antes del parto, el EC fue de $3,27 \pm 0,04$ y al parto próximo a 3. Esto concuerda con los resultados de AGNE y BHB, explicando que, si bien hubo una pérdida de EC en parto, la pérdida fue moderada. El excesivo EC al parto desencadena una disminución mayor del consumo, un incremento en la producción de leche, mayor requerimiento de lactosa para esa producción de leche, menor energía disponible para la oxidación completa de los AGNE, lo que predispone a mayor acumulación de ácidos grasos en el hígado y mayor producción de BHB (Roche y col. 2009).

En este proyecto no se encontró efecto del EC parto sobre la producción de leche, a diferencia de lo publicado por Roche y col. (2007). En dicho estudio, se determinó que aquellas vacas con mayor EC parto, llegaron más rápido al pico de producción de leche, y dicho pico fue más alto. En la publicación de Roche y col. (2007), también se determinó que el EC al parto con el cual se logró la mayor producción de leche, fue de 3,5, aunque posteriormente se reportó que existen escasas diferencias en producción entre vacas que paren entre 3,0 y 3,5 (Roche y col., 2009).

La paridad en este trabajo afectó la producción de leche y la composición de la leche. La producción de leche fue mayor en vacas multíparas que en vacas primíparas, en concordancia con otros trabajos (Adrien y col. 2007, Morales y col. 2018). Con relación a la proteína de leche, las vacas multíparas presentaron mayor concentración de proteína en leche. Morales y col. (2018) reportaron también mayor cantidad (kilos) de proteína en leche en vacas multíparas, en relación a las primíparas. Además, hubo un efecto de la enfermedad sobre el porcentaje de proteína en la leche. El mayor porcentaje

de proteína de la leche en vacas enfermas, seguramente se debió a que esas vacas, en su mayoría, presentaron mastitis. Este hecho ya ha sido reportado por Gonçalves y col. (2018) quienes encontraron mayor porcentaje de proteína asociados a altos recuentos de células somáticas en la leche.

Con relación a la enfermedad y la producción de leche, no se encontraron diferencias en la producción de vacas enfermas y vacas sanas, como si se ha reportado previamente (Drackley, 1999). Esto podría deberse a que el nivel de producción de las vacas de este trabajo, no fue muy elevando como para determinar diferencias significativas entre vacas sanas y enfermas. Sin embargo, las vacas enfermas con mastitis, produjeron leche con mayor porcentaje de proteína que las vacas sanas, pero durante el primer mes posparto. Estas diferencias en el porcentaje de proteínas de la leche seguramente están asociados al proceso inflamatorio de la glándula mamaria.

No se observaron diferencias en concentración de AGNE ni de BHB según paridad, en concordancia con el estudio realizado por Adrien y col. (2012). Sin embargo, contrasta con lo publicado por Meikle y col. (2004), quienes encontraron que las vacas primíparas presentaron mayor concentración de AGNE que las vacas multíparas. Daros y col. (2017) encontraron que las vacas primíparas presentaron menor riesgo de presentar cetosis subclínica, y por lo tanto son menos propensas a sufrir de las enfermedades posparto relacionadas con altas concentraciones de BHB; este reporte coincide con los datos encontrados en este ensayo. Además, en general, las concentraciones de AGNE y BHB estuvieron tanto en el preparto como durante el posparto, en niveles aceptables y saludables. Teniendo en cuenta los criterios utilizados por LeBlanc, quien establece que concentraciones de AGNE > 0.4 mmol/L en los últimos 7 a 10 días previos al parto, predisponen a desplazamiento de abomaso, retención de placenta y descarte de esos animales, en los primeros 60 días posparto, es que podemos afirmar que es probable que la limitada movilización de reservas no haya tenido impacto en la salud de las vacas. Además, siguiendo los criterios de LeBlanc (2010), las vacas del presente estudio no tuvieron problemas de cetosis subclínica que hayan predispuesto a mayor incidencia de enfermedades. LeBlanc (2010) menciona que vacas que en la primera y/o segunda semana posparto, alcanzan concentraciones de BHB > 1.2 mmol/L tienen mayor riesgo a tener enfermedades varias en el posparto.

En contraste, Meikle y col. (2004) reportaron que las vacas primíparas presentaron más muestras con valores de BHB por encima de 1 mmol/L. En la publicación de Meikle y col. (2004) también se encontraron diferencias en el EC según paridad. Sin embargo, en el presente no se encontraron dichas diferencias entre las categorías, lo que puede explicar el por qué tampoco se encontraron diferencias en movilización de reservas (AGNE y BHB) entre las dos categorías. Lo interesante del presente trabajo es que, a pesar de partir de similar EC, las vacas multíparas igual produjeron mayor cantidad de leche, lo que podría estar explicado por un mayor consumo de alimento. Sin embargo, cuando se evaluó la concentración de colesterol, utilizado en otros trabajos como indicador del BEN y del consumo (Cavestany y col., 2009; Adrien y col., 2012; Meikle y col., 2013) esto no fue confirmado, debido a que no hubo efecto de la paridad sobre la concentración de colesterol.

En cuanto a la concentración de proteínas totales y globulinas, se encontró un descenso en la concentración en los días cercanos al parto, similar a lo reportado anteriormente (Adrien y col., 2012; Meikle y col., 2013), lo que caracteriza a este periodo de transición. También se observó que en las vacas enfermas la concentración de proteínas totales aumentó rápidamente luego del parto. Similar perfil presentó la concentración de globulinas. El incremento en las globulinas luego del parto en las vacas enfermas es en respuesta a la enfermedad de origen inflamatoria. En relación con esto, recientemente se ha reportado que las globulinas séricas son un buen indicador de inflamación en vacas con altos recuentos de células somáticas en leche (Bobbo y col., 2017). Si bien no se encontró una menor concentración de albúmina en las vacas enfermas, como se ha reportado previamente, se la ha identificado como proteína negativa con relación a la inflamación (Bertoni y col., 2008; Pohl y col., 2015). En este trabajo se encontró una correlación negativa entre albúmina y haptoglobina, lo cual indica que la albúmina es una proteína que disminuye cuando la haptoglobina se encuentra a alta concentración. Justamente, la haptoglobina sérica se asoció a enfermedades clínicas como mastitis y metritis, y también a la mastitis subclínica. Otros autores ya habían reportado que la concentración de haptoglobina aumenta en vacas con metritis (Huzzey y col., 2009), mastitis clínica (Eckersall y col., 2001) y mastitis subclínica (Nazifi y col., 2011). En el presente trabajo, hubo un pico en la concentración de Hp que ocurrió en las vacas con metritis entorno al parto. Esto coincide con estudios de Huzzey y col. (2009), quienes reportaron que las vacas con concentración de Hp ≥ 1 g/L al tercer día posparto, presentaban 6,7 veces más chances de desarrollar metritis. Esta mayor concentración de Hp en vacas con metritis se puede asociar al tipo de enfermedad, debido a que la metritis puerperal usualmente causa una reacción sistémica con fiebre, anorexia, y otros síntomas de toxemia (Sheldon y col., 2006), lo cual provoca una respuesta inflamatoria importante. Otros autores, también han reportado que Hp $\geq 0,8$ g/L en los primeros 7 días posparto estuvo asociado a dos veces más chances de desarrollar metritis (Dubuc y col., 2010).

Lo interesante de este trabajo fue que las vacas sanas, si bien presentaron menor concentración que las vacas enfermas, igual tuvieron un incremento en la concentración de Hp alrededor del parto. Este aumento probablemente se deba a una respuesta inflamatoria fisiológica ocasionada por el parto. La inflamación en ese periodo es un proceso necesario para que se establezcan las adaptaciones fisiológicas durante el periodo de transición, como lo son el inicio del parto y la involución uterina (Bradford y col., 2015). Además, el aumento de Hp en este momento es fundamental debido al efecto antiinflamatorio que presenta (Ceciliani y col., 2012).

Por otra parte, se observó un resultado interesante en el perfil de Hp para vacas con mastitis subclínica, debido a que la concentración no solo se elevó en la primera semana, sino que también lo hizo en la tercer y cuarta semana posparto. Esto puede haberse relacionado a que la mastitis subclínica tiende a la cronicidad con períodos de exacerbación (Nazifi y col., 2011). Nazifi y col (2011) reportaron que las vacas con mastitis clínica tienen mayor concentración de Hp que aquellas con mastitis subclínica.

Cuando consideramos Hp como indicador de mastitis, es importante tener en cuenta que Hp también se produce a nivel extrahepático, en la glándula mamaria (Cecilian y col, 2012). Es por esta razón que Nielsen y col (2004) reportaron que vacas con mastitis clínica presentaron bajos niveles de Hp en suero, pero altos niveles de Hp en leche. Eckersall y col. (2001) demostraron que la medición de Hp en leche tiene mayor sensibilidad, especificidad y eficacia en el diagnóstico de vacas con mastitis, al compararlo con la medición de Hp sérica.

Algunos autores han reportado que las vacas primíparas presentan mayor concentración de Hp que las múltíparas luego del parto, atribuyéndolo al mayor grado de lesiones producidas en el parto de primíparas (Pohl y col, 2015), sin embargo, en este trabajo no se observó dicho efecto.

En este estudio no se encontraron diferencias significativas con respecto al calcio entre L1 o L2, ni entre sanas o enfermas. Según la bibliografía consultada, la hipocalcemia aumenta la susceptibilidad de las vacas a desarrollar enfermedades como mastitis y retención de placenta, debido a que se reduce la habilidad de las células inmunes a responder a estímulos. Además, se reduce la contractilidad muscular, evita el cerrado eficiente del esfínter del pezón, favoreciendo la mastitis de ese modo también. En este ensayo las vacas enfermas no tuvieron valores de calcemia más bajos que las sanas, por lo cual no podemos establecer la relación entre hipocalcemia y enfermedad. Esto puede deberse a que, según los valores encontrados, ningún animal presentó hipocalcemia clínica (calcemia menor a 1,5 mmol/L; Reinhardt y col., 2011), y solo el 25% de los animales presentaron hipocalcemia subclínica ($\leq 2,0$ mmol/L; Reinhardt y col., 2011) en la primera semana posparto. Según el ensayo de Reinhardt y col. (2011), en ambos de EEUU, la prevalencia de hipocalcemia subclínica en vacas L1 fue de 25%, mientras que en vacas L2 fue de 47%. Otro aspecto para resaltar es que los muestreos de sangre no se realizaron exactamente en las primeras 48 horas posparto, sino que hubo animales con sangrados entre 0 y 7 días posparto, lo cual pudo haber alterado los resultados de dicho análisis. Según Goff (2008), el nadir de calcemia ocurre entre las 12 y 24 horas posparto.

En cuanto a los datos del hemograma, se observó un descenso marcado de glóbulos blancos en el posparto, lo cual concuerda con la inmunosupresión del periparto. En el ensayo de Kehrl y col. en 1989 se determinó que 2 semanas previas al parto hay un aumento en el recuento de glóbulos blancos, causado principalmente por un aumento de los neutrófilos. Luego, a la semana posparto descienden los neutrófilos. Además, en el presente trabajo, ocurrió un descenso del hematocrito y hemoglobina, y una tendencia a que descendieran los glóbulos rojos en el primer mes posparto. Todos los datos coinciden ampliamente con un estudio que realizó Moretti y col. en 2017, en el cual su objetivo fue determinar valores de referencia en el periparto de vacas sanas. Enemark y col. (2009) determinaron que durante el parto existe una hemoconcentración importante, causada principalmente por el descenso del consumo periparto, la pérdida de fluidos

uterinos durante el parto, y la pérdida de agua por la leche. Esto puede explicar por qué el hematocrito va descendiendo a medida que transcurren los meses posparto.

10. CONCLUSIONES

En este trabajo se encontró que cerca del treinta por ciento de las vacas enfermaron en los primeros dos meses posparto, y que la mastitis fue la principal enfermedad.

Sin embargo, los resultados del sistema inmune y metabólico no concuerdan con lo reportado en vacas alimentadas con TMR *ad libitum*, donde la gran movilización de las reservas grasas parece ser el principal problema asociado a la incidencia de enfermedades.

El perfil de proteínas totales y globulinas parece ser un buen indicador de los procesos inflamatorios/infecciosos, en conjunto con la haptoglobina sérica en los casos de metritis.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adewuyil, AA; Gruysi, E; van Eerdenburg FJCM. 2005. Non esterified fatty acids (NEFA) in dairy cattle. A review. *Veterinary Quarterly*. 27(3): 117-126.
- Adrien, ML; Mattiauda, DA; 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 post-partum ovarian cyclicity and metabolic parameters. *Animal*. 6(2): 292-299.
- Astessiano, AL; Chilbroste, P; Fajardo, M; Laporta, J; Gil, J; Mattiauda, D; Meikle, A; Carriquiry, M. 2012. Hepatic expression of GH-IGF axis genes in Holstein cows with different nutritional managements during early lactation. *J Dairy Sci*, 95(2): 348.
- Bargo, F; Muller LD; Delahoy JE; Cassidy TW. 2002. Performance of high producing dairy cows with three different feeding systems combining pasture and total mixed rations. *J Dairy Sci*. 85:2948-2963.
- Barkema, HW; Schukken, YH; Lam, TJGM; Beiboer, ML; Wilmink, H; Benedictus, G; Brand, A. 1998. Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. *J Dairy Sci*, 81(2): 411-419.
- Bertoni, G; Trevisi, E; Han, X; Bionaz, M. 2008. Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. *J Dairy Sci*, 91(9): 3300-3310.
- Blowey, R. 2005. Factors associated with lameness in dairy cattle. In *Practice*. 27: 154-162.
- Bobbo, T; Fiore, E; Giancesella, M; Morgante, M; Gallo, L; Ruegg, P; Cecchinato, A. 2017. Variation in blood serum proteins and association with somatic cell count in dairy cattle from multi-breed herds. *Animal*, 11(12): 2309-2319.
- Bradford, BJ; Yuan, K; Farney, JK; Mamedova, LK; Carpenter, AJ. 2015. *Invited review*: Inflammation during the transition to lactation: New adventures with an old flame. *J Dairy Sci*. 98(10): 6631-6650.
- Burke, C; Roche, R. 2007. Effects of pasture feeding during the periparturient period on postpartum anovulation in grazed dairy cows. *J Dairy Sci*. 90:4304-4312.
- Cai, T; Weston, PG; Lund, LA; Brodie, B; McKenna, DJ; Wagner, WC. 1994. Association between neutrophil functions and periparturient disorders in cows. *Am. J. Vet. Res*. 55: 934-943.
- Cavestany, D; Blanc, JE; Kulcsar, M; Uriarte, G; Chilbroste, P; Meikle, A; Febel, H; Ferraris, A; Krall, E. 2005. Studies of the transition cow under and pasture-based milk production system: metabolic profiles. *J Vet Med A*. 52: 1-7.
- Cavestany, D; Viñoles, C; Crowe, MA; La Manna, A; Mendoza, A. 2009. Effect of prepartum diet on postpartum ovarian activity in Holstein cows in a pasture-based dairy system. *Animal Reproduction Science*. 114: 1-13.
- Cecilian, F; Ceron, J J; Eckersall, PD; Sauerwein, H. 2012. Acute phase proteins in ruminants. *Journal of Proteomics*, 75(14): 4207-4231.

- Chabalgoity, JA; Baz, A; Rial, A; Grille, S. 2007. The relevance of cytokines for development of protective immunity and rational design of vaccines. *Cytokine & Growth factor Reviews*. 18 (1-2): 197-207.
- Chamberlin, WG; Middleton, JR; Spain, JN; Johnson, GC; Ellersieck, MR; Pithua, P. 2013. Subclinical hypocalcemia, plasma biochemical parameters, lipid metabolism, postpartum disease, and fertility in postparturient dairy cows. *J Dairy Sci*. 96 (11): 7001-7013.
- Chilibroste, P; Mattiauda, D; Soca, P; Bentancour, O; Meikle, A. 2012. Effect of herbage allowance on grazing behavior and productive performance of early lactation primiparous Holstein cows. *Animal Feed Science and Technology*. 173: 201-209.
- Chilibroste, P; Battegazzore, G. 2014. Proyecto Producción Competitiva. CONAPROLE, pp 31.
- Chilibroste, P. 2015. Los sistemas lecheros en escenarios de precios volátiles. 2do Foro de Producción Lechera. Sistemas sostenibles en distintos escenarios. CONAPROLE.
- DeVlieghe, S; Ohnstad, I; Piepers, S. 2018. Management and prevention of mastitis: A multifactorial approach with a focus on milking, bedding and data-management. *Journal of Integrative Agriculture*. 17(6): 1214–1233.
- DIEA. Anuario estadístico agropecuario 2012. www.mgap.gub.uy.
- Drackley, JK. 1999. Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier? *J Dairy Sci*. 82(11): 2259-2273.
- Drillich, M; Voigt, D; Forderung, D; Heuwieser, W. 2007. Treatment of acute puerperal metritis with flunixin meglumine in addition to antibiotic treatment. *J Dairy Sci*. 90: 3758-3763.
- Duffield, TF; Lissemore, KD; McBride, BW; Leslie, KE. 2009. Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *J Dairy Sci*. 92: 571-580.
- Duffield, TF; LeBlanc, SJ. 2009. Interpretation of serum metabolic parameters around the transition period. In *Southwest Nutrition and Management Conference*. Vol. 1, pp. 106-114.
- Dubuc, J; Duffield, TF; Leslie, KE; Walton, JS; LeBlanc, SJ. 2010. Risk factors for postpartum uterine diseases in dairy cows. *J. Dairy Sci*. 93: 5764-5771.
- Eckersall, PD. 1995. Acute phase proteins as markers of inflammatory lesions. *Comp Haematol Int* 5:93-97.
- Eckersall, PD; Young, FJ; McComb, C; Hogarth, CJ; Safi, S; Weber, A; McDonald, T; Nolan, AM; Fitzpatrick, JL. 2001. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. *Vet Rec* 148(2):35-41.
- Edmonson, AJ; Lean, L; Weaver, LD; Farver, T and Wevster, G. 1989. A body condition scoring chart for holstein dairy cows. *J Dairy Sci*. 72:68-78.
- Enemark, JMD; Schmidt, HB; Jakobsen, J; Enevoldsen, C. 2008. Failure to improve energy balance or dehydration by drenching transition cows with water and electrolytes at calving. *Vet Res Commun*. 33:123–137

- Galvão, KN; Greco, LF; Vilela, JM; Sá Filho, MF; Santos, JEP. 2009. Effect of intrauterine infusion of ceftiofur on uterine health and fertility in dairy cows. *J Dairy Sci.* 92(4): 1532-1542.
- Galvão, KN; Flaminio, MJB; Brittin, SB; Sper, R; Fraga, M; Caixeta, L; Ricci, A; Guard, CL; Butler, WR; Gilbert, RO. 2010. Association between uterine disease and indicators of neutrophil and systemic energy status in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci.* 93: 2926-2551.
- Galvão, KN; Felipe, MJB; Brittin, SB; Sper, R; Fraga, M; Galvão, JS; Caixeta, L; Guard, CL; Ricci, A; Gilbert, RO. 2012. Evaluation of cytokine expression by blood monocytes of lactating Holstein cows with or without postpartum uterine disease. *Theriogenology.* 77: 356-372.
- Godson, DL; Campos, M; Attah-Poku, SK; Redmond, MJ; Cordeiro, DMM; Sethi, MS; Harland, RJ; Babiuk, LA. 1996. Serum haptoglobin as an indicator of the acute phase response in bovine respiratory disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 51: 277-292.
- Goff, JP. 2008. The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *Vet J.* 176: 50-57.
- Gonçalves, JL; Kamphuis, C; Martins, CMMR; Barreiro, JR; Tomazi, T; Gameiro, AH; Hogeveen, HH; dos Santos, MV. 2018. Bovine subclinical mastitis reduces milk yield and economic return. *Livestock Sci.* 210: 25-32.
- Gong JG. 2002. Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications. *Dom. Anim. Endocrinol.* 23: 229–241.
- Grohn, YT; Erb, HN; McCulloch, CE; Saloniemi, HS. 1989. Epidemiology of Metabolic Disorders in Dairy Cattle: Association Among Host Characteristics, Disease, and Production. *J Dairy Sci.* 72:1876-1885.
- Grummer, RR. (1995). Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *J Anim Sci.* 73: 2820-2833.
- Grummer, RR; Mashek, DG y Hayirli, A. (2004). Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Vet .Clin. N.A Food Anim.Pract.* 20:447-470.
- Hagiwara, K; Yamanaka, H; Hisaeda, K; Taharaguchi, S; Kirisawa, R; Iwai, H. 2001. Concentrations of IL-6 in serum and whey from healthy and mastitic cows. *Veterinary Research Communications.* 25: 99-108.
- Huzzey, JM; Duffield, TF; LeBlanc, SJ; Veira, DM; Weary, DM; von Keyserlingk, MAG. 2009. Short communication: Haptoglobin as an early indicator of metritis. *J. Dairy Sci.* 92: 621-625.
- Ingvarsen, KL; Dewhurst, RJ; Friggens, NC. 2003. On the relationship between lactational performance and health: is it yield or metabolic imbalance that cause production diseases in dairy cattle? A position paper. *Livestock Production Science* 83: 277-308.
- Islam, R; Kumar, H; Nandi, S; Rai, RB. 2013. Determination of anti-inflammatory cytokine in periparturient cows for prediction of postpartum reproductive diseases. *Theriogenology.* 79: 974-979.

- Kehrl, M. E., B. J. Nonnecke, and J. A. Roth. 1989. Alterations in bovine peripheral blood neutrophil function during the peripartum period. *Am. J. Vet. Res.* 50:207–214.
- Kimura, K; Reinhardt, TA; Goff, JP. 2006. Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle. *J Dairy Sci.* 89(7): 2588-2595.
- Kimura, K; Goff, JP; Canning, P; Wang, C; Roth, JA. 2014. Effect of recombinant bovine granulocyte colony-stimulating factor covalently bound to polyethylene glycol injection on neutrophil number and function in periparturient dairy cows. *J Dairy Sci.* 97(8): 4842-4851.
- Kolver, ES; Müller, LD. 1998. Performance and nutrient intake of high producing Holstein cows consuming pasture or a total mixed ration. *J Dairy Sci.* 81:1403-1411.
- LeBlanc, SJ; Lissemore, KD; Kelton, DF; Duffield, TF; Leslie, KE. 2006. Major advances in disease prevention in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 89:1267–1279.
- LeBlanc, S. 2010. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *Journal of Reproduction and Development.* 56 (suppl): S29-S35.
- Meikle, A; Kulcsar, M; Chilliard, Y; Febel, H; Delavaud, C; Cavestany, D y Chilbroste, P. 2004. Effects of parity and body condition at parturition on endocrine and reproductive parameters of the cow. *Reproduction.* 127: 727-737.
- Meikle, A; Cavestany, D; Carriquiry, M; Adrien, ML; Artegoitia, V; Pereira, I; Rupprechter, G; Pessina, P; Rama, G; Fernández, A; Breijo, M; Laborde, D; Pritsch, O; Ramos, JM; de Torres, E; Nicolini, P; Mendoza, A; Dutour, J; Fajardo, M; Astessiano, AL; Olazábal, L; Mattiauda, D; Chilbroste, P. 2013. Avances en el conocimiento de la vaca lechera durante el período de transición en Uruguay: un enfoque multidisciplinario. *Agrociencia Uruguay.* 17(1): 141-152.
- Morales Piñeyría, JT; Fariña, SR; Mendoza, A. 2018. Effects of parity on productive, reproductive, metabolic and hormonal responses of Holstein cows. *Animal Reproduction Science.* 191: 9-21.
- Moretti, P; Paltrinieri, S; Trevisi, E; Probo, M; Ferrari, A; Minuti, A; Giordano, A. 2017. Reference intervals for hematological and biochemical parameters, acute phase proteins and markers of oxidation in Holstein dairy cows around 3 and 30 days after calving. *Research in Veterinary Science.* 114: 322–331.
- Nagahata, H; Noda, H; Abe, T. 1987. Changes in blastogenic response of bovine lymphocytes during acute clinical mastitis. *Jpn. J. Vet. Sci.* 49:1148–1150.
- Nazifi, S; Haghkhah, M; Asadi, Z; Ansari-Lari, M; Tabandeh, M. R; Esmailnezhad, Z; Aghamiri, M. 2011. Evaluation of sialic acid and acute phase proteins (haptoglobin and serum amyloid A) in clinical and subclinical bovine mastitis. *Pakistan Veterinary Journal* 31(1): 55-59.
- Nielsen, BH; Jacobsen, S; Andersen, PH; Niewold, TA; Heegaard, PMH. 2004. Acute phase protein concentrations in serum and milk from healthy cows, cows with clinical mastitis and cows with extramammary inflammatory conditions. *Vet Record.* 154: 361-365.
- Mulligan, FJ; Doherty, ML. 2008. Production diseases of the transition cow. *Vet J.* 176: 3-9.

- Pedron, O; Cheli, F; Senatore, E; Baroli, D and Rizzi, R. 1993. Effect of body condition score at calving on performance, some blood parameters, and milk fatty acid composition in dairy cows. *J Dairy Sci* 76:2528-2535.
- Pereira, I; Laborde, D; Carriquiry, M; López-Villalobos, N; Meikle A. 2010. Blood metabolic profiles in Uruguayan Holstein and Uruguayan Holstein x New Zealand Holstein-Friesian dairy cows. *Proceedings New Zealand Society of Animal Production*, 70: 311-315.
- Pereira, I; Cruz, I; Ruprecht, G; Meikle, A. 2017. Salud y eficiencia reproductiva de vacas lecheras en sistemas de base pastoril de Florida: resultados preliminares del monitoreo. Poster presentado en XLV Jornadas Uruguayas de Buiatria.
- Pohl, A; Burfeind, O; Heuwieser, W. 2015. The associations between postpartum serum haptoglobin concentration and metabolic status, calving difficulties, retained fetal membranes, and metritis. *Journal of dairy science*, 98(7): 4544-4551.
- Reinhardt, TA; Lippolis, JD; McCluskey, BJ; Goff, JP; Horst, RL. 2011. Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. *Vet J.* 188: 122-124.
- Ribeiro, ES; Lima, FS; Greco, F; Bisinotto, S; Monteiro, PA; Favoreto, M; Ayres, H; Marsola, S; Martinez, N; Thatcher, WW; Santos, JEP. 2013. Prevalence of periparturient diseases and effects on fertility of seasonally calving grazing dairy cows supplemented with concentrates. *J Dairy Sci.* 96(9): 5682-5697.
- Roche, JR; Lee, JM; Macdonald, KA. 2007. Relationships Among Body Condition Score, Body Weight, and Milk Production Variables in Pasture-Based Dairy Cows. *J Dairy Sci.* 90(8): 3802-3815.
- Roche, JR; Friggens, NC; Kay, JK; Fisher, MW; Stafford, KJ; Berry, DP. 2009. Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *J Dairy Sci.* 92(12): 5769-5801.
- 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.
- Sato, S; Suzuki, T; Okada, K. 1995. Suppression of mitogenic response of bovine peripheral blood lymphocytes by ketone bodies. *J Vet. Med. Sci.* 57(1): 183-185.
- Seifi, HA; LeBlanc, SJ; Leslie, KE; Duffield, TF. 2011. Metabolic predictors of postpartum disease and culling risk in dairy cattle. *Vet J.* 188: 216-220.
- Sheldon, IM; Lewis, GS; LeBlanc, S; Gilbert, RO. 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology.* 65 (8): 1516-1530.
- Sordillo, LM; Pighetti, GM; Davis, MR. 1995. Enhanced production of bovine tumor necrosis factor- α during the periparturient period. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 49: 263-270.
- Tadich, N; Tejada, C; Bastias, S; Rosenfeld, C; Green, LE. 2013. Nociceptive threshold, blood constituents and physiological values in 213 cows with locomotion scores ranging from normal to severely lame. *Vet J.* 197(2):401-405.
- Tizard, I. 2009. Introducción a la inmunología veterinaria. Ed. Elsevier 8va ed. Texas.

- Washburn, SP; White, SL; Green, JT; Benson, GA. 2002. Reproduction, mastitis, and body condition of seasonally calved Holstein and Jersey cows in confinement or pasture systems. *J Dairy Sci.* 85(1): 105-111.
- Whitaker D, Goodger W, Garcia M, Perera B, Wittwer F. 1999. Use of metabolic profiles in dairy cattle in tropical and subtropical countries on smallholder dairy farms. *Prev Vet Med.* Jan 27; 38(2-3):119-31.
- Willard M, Tvedten H. 2012. *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*. Ed. Elsevier 5ta ed. Missouri.