



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**ALTERACIONES UTERINAS Y OVÁRICAS EN LA
OCURRENCIA DE INFECCIONES UTERINAS POSPARTO**

BERNARDO LOCKHART

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

URUGUAY

2021



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**ALTERACIONES UTERINAS Y OVÁRICAS EN LA
OCURRENCIA DE INFECCIONES UTERINAS POSPARTO**

Bernardo Lockhart

Gustavo Gastal

Director de tesis

Ana Meikle

Codirectora

2021

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

Daniel Cavestany; PhD

Director Académico del Programa de Posgrado

Facultad de Veterinaria, Universidad de la República – Uruguay

María de Lourdes Adrien, PhD

Departamento de Salud en los Sistemas Pecuarios

Facultad de Veterinaria, Universidad de la República – Uruguay

Joao Alvarado; Zootecnista, PhD

Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária - NUPEEC

Campus Capão do Leão, Pelotas - RS, Brasil

ACTA DE DEFENSA DE TESIS



ACTA DE EXAMEN

CURSO: Defensa de Tesis de Maestría

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: Sala Virtual de Plataforma Zoom, Facultad de Veterinaria, UdelaR, martes 13 de abril de 2021

Tribunal: Dr. Daniel Cavestany, Dra. María de Lourdes Adrien, Dr. Joao Alveiro Alvarado Rincón

CI ESTUDIANTE	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
3419074-0	LOCKHART MARTÍNEZ, Bernardo Enrique	S.S.S.	12

PRESENTADOS	NO PRESENTADOS	APROBADOS	APLAZADOS	INSCRIPTOS
1	0	1	0	1

TRIBUNAL

FIRMA

Dr. Daniel Cavestany Dra. María de Lourdes Adrien Dr. Joao Alveiro Alvarado Rincón

AGRADECIMIENTOS

A las autoridades del Instituto Nacional de investigación Agropecuaria, que mediante el Plan de Formación de Estudiantes de Posgrado pusieron a disposición sus instalaciones, investigadores, personal y financiamiento para el desarrollo de este trabajo.

A mis orientadores: Gustavo, gracias por confiar desde el principio y acompañarme en cada etapa, por ayudarme con tus conocimientos y templanza y a abrir una ventana que desconocía. Ana: gracias por hacerme pensar a través de tu vocación docente y científica.

A Victoria Urioste, compañera de maestría en todas las horas, por estar siempre “al pie del cañón” y por ser parte de este trabajo.

A todo el equipo de la Plataforma de Salud Animal y del Programa de Lechería de INIA por estar siempre, por la ayuda, las enseñanzas y por la energía positiva.

A todas las personas que enriquecen el camino con información, intercambio de ideas y sugerencias: compañeros de oficina, estudiantes de otras áreas, investigadores de INIA y de Facultad de Veterinaria.

A las integrantes del LEMA (Facultad de Veterinaria) por el apoyo brindado en los análisis e interpretación.

A mi familia y amigos que creyeron y me alentaron para afrontar este desafío.

INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	iv
SUMMARY	v
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1. Puerperio normal, reinicio de la ciclicidad ovárica y balance energético negativo en la vaca lechera	7
1.2. Balance energético negativo, funcionamiento del sistema inmune y enfermedad	9
1.3. Infección uterina, inflamación y marcadores biológicos	11
1.4. Procesos inflamatorios y su asociación con la irrigación sanguínea ovárica y uterina	13
1.5. Consecuencias de las infecciones uterinas sobre el eje reproductivo.....	13
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
3. HIPÓTESIS	16
4. OBJETIVOS.....	16
4.1. Objetivo general.....	16
4.2. Objetivos específicos	16
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
5.1. Vacas y diseño experimental	17
5.2. Exámenes clínicos.....	18
5.3. Exámenes ecográficos.....	19
5.3.1. Útero	19
5.3.2. Ovarios	19
5.4. Citología uterina	19
5.5. Colectas de sangre	20
5.5.1. Perfil metabólico y hormonal	20
5.6. Análisis estadísticos.....	21
6. RESULTADOS.....	22
6.1. Exámenes clínicos.....	22
6.2. Citología.....	23
6.3. Exámenes ecográficos.....	24
6.3.1. Útero	24
6.3.2. Ovarios	26
6.4. Datos de producción y perfil metabólico	27

7. DISCUSIÓN.....	30
8. CONCLUSIONES	36
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
10. ANEXO I.....	48

RESUMEN

Las infecciones uterinas posparto (metritis y endometritis) impactan negativamente el desempeño productivo y reproductivo en rodeos lecheros. El efecto de la infección uterina sobre las estructuras uterinas y ováricas, perfiles metabólicos y marcadores inflamatorios no está completamente comprendido. En esta tesis se realizó un experimento en bovinos de leche para evaluar los cambios en las estructuras ováricas y uterinas durante los primeros 43 días posparto (DPP) causados por infecciones uterinas sin sintomatología sistémica. Se utilizaron vacas primíparas Holstein ($n = 36$) monitoreadas a los -8 días preparto, durante el parto y a los 9, 15, 22, 29, 36 y 43 DPP para determinar, parámetros de perfil metabólico, comportamiento de parto, descarga vaginal, porcentaje de células polimorfonucleares endometriales, diámetro de cuerno y arteria uterinos, espesor endometrial, número total de folículos antrales, diámetro del folículo dominante, y cuerpo lúteo (CL), días a primera ovulación y el flujo sanguíneo del folículo dominante. Los parámetros sanguíneos considerados fueron progesterona, NEFA, BHB, insulina, IGF-I, albúmina, haptoglobina y calcio. Datos de peso vivo y producción de leche fueron registrados. Luego, para los análisis retrospectivos, los animales fueron agrupados en vacas sanas y enfermas (con diagnóstico clínico de infección uterina). En general, 41.7 % (15/36) de los animales fueron diagnosticados con infección uterina a los 15 DPP. La citología fue mayor en vacas con descarga vaginal purulenta. El diámetro del cuerno uterino fue menor en vacas sanas a los 9 y 15 DPP. Por el contrario, el espesor endometrial fue mayor a los 9 DPP en vacas sanas que en las de infección uterina. El recuento folicular, diámetro del folículo dominante y su flujo sanguíneo, el intervalo parto- primera ovulación, tamaño de CL y concentración de progesterona, no fueron afectados por la presencia de la infección uterina. Las vacas enfermas redujeron su producción en 2.5 litros por día. Respecto a los parámetros sanguíneos, independiente de los grupos, NEFA fue más alto en la primera semana posparto (9 DPP) comparado con todos los otros días de evaluación, en cuanto BHB fue mayor durante todo el período posparto comparado con el preparto. Vacas diagnosticadas con infección uterina presentaron mayor concentración de haptoglobina en el preparto y menor concentración de albumina desde el preparto hasta 43 DPP. No hubo diferencia en la concentración sanguínea de insulina e IGF- I entre vacas sanas y enfermas. En síntesis, la infección uterina en vacas primíparas en sistemas pastoriles impacta negativamente en la producción de leche y peso vivo animal y afecta la involución uterina posparto (un cuerno uterino mayor y un espesor de endometrio menor) hasta 15 DPP. Estos cambios tempranos de la estructura uterina se asocian con marcadores sanguíneos (albúmina/haptoglobina) que preceden el diagnóstico clínico de la infección uterina.

SUMMARY

Postpartum uterine infections (metritis and endometritis) negatively impact productive and reproductive performance in dairy herds. The effect of uterine infection on uterine and ovarian structures, metabolic profiles, and inflammatory markers is not fully understood. In this study, an experiment was carried out in dairy cattle to evaluate the changes in the ovarian and uterine structures during the first 43 postpartum days (PPD) caused by uterine infections without systemic symptoms. Holstein primiparous cows (n = 36) monitored at -8 days prepartum, during calving and at 9, 15, 22, 29, 36 and 43 PPD were used to determine metabolic profile parameters, calving behavior, vaginal discharge, percentage of endometrial polymorphonuclear cells, uterine horn diameter, endometrial thickness, total number of antral follicles, diameter of the dominant follicle, and corpus luteum, days to first ovulation, and dominant follicle blood flow. The blood parameters considered were progesterone, NEFA, BHB, insulin, IGF-I, albumin, haptoglobin, and calcium. Body weight and milk production data were recorded. Then, for retrospective analyzes, the animals were grouped into healthy and diseased cows (with a clinical diagnosis of uterine infection). Overall, 41.7 % (15/36) of the animals were diagnosed with uterine infection at 15 PPD. Cytology was higher in cows with purulent vaginal discharge. The diameter of the uterine horn was smaller in healthy cows at 9 and 15 PPD. The endometrial thickness was greater at 9 PPD in healthy cows than in those with uterine infection. Follicular count, diameter of the dominant follicle and its blood flow, parturition-first ovulation interval, corpus luteum size, and progesterone concentration were not affected by the presence of uterine infection. The sick cows produced 2.5 liters / cow / day, less milk. Regardless of the groups, NEFA was higher in the first postpartum week (9 PPD) compared to all the other evaluation days, as BHB was higher during postpartum period compared to prepartum period. Cows diagnosed with uterine infection had a higher haptoglobin concentration in prepartum and a lower albumin concentration from prepartum up to 43 PPD. There was no difference in insulin and IGF-I between healthy and diseased cows. In summary, uterine infection in primiparous cows in grazing systems negatively impacts milk production and animal live weight and affects postpartum uterine involution (a larger uterine horn and a lesser endometrial thickness) up to 15 PPD. These early changes in uterine structure are associated with blood markers (albumin / haptoglobin) that precede the clinical diagnosis of uterine infection.

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro I. Ingredientes de ración totalmente mezclada preparto.....	17
Cuadro II. Descripción de frecuencia de partos con problemas e infecciones uterinas posparto hasta el día 43 posparto, en vacas Holstein primíparas.	22
Cuadro III. Efectos fijos incluidos en el modelo para los análisis de las siguientes variables: citología, recuento folicular, diámetro de folículo dominante, flujo sanguíneo del folículo dominante, diámetro del cuerpo lúteo, concentración de progesterona, producción de leche, peso vivo, NEFA, BHB, Albúmina, Haptoglobina, Insulina, IGF- I y Calcio. Los efectos fijos son: Grupo(G), Tiempo (T), y sus interacciones (G*T).	23
Figura 1. Diseño experimental consistió en un período desde 8 días antes del parto hasta 43 días posparto (DPP) para realización de evaluaciones ecográficas, vaginoscopia y colecta de muestras de sangre y uterina (citología).....	18
Figura 2. Porcentaje de PMN (promedio \pm E.E.M.) en vacas sanas y con infección uterina en función de los días posparto.	24
Figura 3. Diámetro de cuerno uterino (A, B), espesor endometrial (C, D), diámetro de arteria uterina (E, F) (mm; promedio \pm E.E.M.) del cuerno previamente grávido (A, C, E) y del cuerno previamente no grávido (B, D, F) para vacas sanas y con infección uterina en función de los días posparto.	25
Figura 4. Recuento folicular (A) y diámetro del folículo dominante (B) (mm; promedio \pm E.E.M.) en vacas sanas y con infección uterina.	26
Figura 5. Probabilidad de primera ovulación posparto (%) en vacas sanas y vacas con infección uterina.	26
Figura 6. Peso vivo semanal (Kg) (A) y producción de leche diaria (lts/vaca/día) (B) desde el parto a los 45 DPP, en vacas sanas y vacas con infección uterina.	27
Figura 7. Concentración (promedio \pm E.E.M.) de metabolitos: (A) NEFA (mmol/L), (B) BHB (mmol/L), (C) Albúmina (g/L), y (D) Haptoglobina (mg/mL) en vacas sanas y enfermas desde 8 días antes del parto hasta 43 DPP.	28
Figura 8. Concentración sérica (promedio \pm E.E.M.) de calcio en vacas sanas y con infección uterina desde 9 a 43 días posparto.	29

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades uterinas afectan de 30-60% de las vacas lecheras en el primer mes posparto (Gilbert et al., 2005; LeBlanc, 2010; Ribeiro et al., 2013). La incidencia de retención de placenta, metritis y endometritis varían ampliamente a nivel internacional y los autores lo han asociado al tipo de sistema de producción, manejo y categoría animal (Giuliodori et al., 2013) así como también a la precisión del diagnóstico (Denis-Robichaud & Dubuc, 2015). Específicamente se ha reportado que las vacas primíparas sufren mayor incidencia de metritis debido a mayor necesidad de asistencia al parto y mayor desbalance metabólico (Giuliodori et al., 2017).

La retención de placenta, el balance energético negativo (BEN), el bajo score de condición corporal (ECC), la alta producción lechera y la baja inmunidad posparto están entre las principales causas que llevan a un mayor riesgo de inflamación uterina (Cheong et al., 2011; Giuliodori et al., 2013; Lee et al., 2018). Estas causas están interrelacionadas con factores del ambiente, del manejo, metabólicos y hormonales (Daros et al., 2017; De Rensis et al., 2017; Rupprechter et al., 2018). Asociado a estos factores, las vacas de mayor producción de leche presentan mayor incidencia de enfermedad uterina posparto (Gröhn et al., 1990).

Las infecciones uterinas postparto afectan la involución del útero (Heppelmann, et al., 2013b). Si bien existen resultados muy escasos, se ha reportado sobre los cambios de la arteria uterina durante el posparto temprano (Heppelmann, et al., 2013a). Además se ha comprobado que estas afecciones retrasan la primera ovulación y consecuentemente resultan en una menor eficiencia reproductiva (Opsomer et al., 2000; Walsh et al., 2011; Cheong et al., 2017) y productiva (Carvalho et al., 2019). El impacto de estos desórdenes sobre la endocrinología metabólica durante el período de transición en sistemas de producción pastoriles es escasa (Burke et al., 2010).

La información disponible presenta enfoques parciales del problema, concentrándose en sistemas de producción en confinamiento y con muy escasa bibliografía en vacas primíparas que son el futuro del rodeo. Por lo tanto, la finalidad de esta tesis fue investigar los efectos de infecciones uterinas puerperales sobre características anatómicas y fisiológicas del útero, producción de leche y fisiología ovárica durante la lactancia temprana de vacas primíparas en sistemas pastoriles.

1.1 Puerperio normal, reinicio de la ciclicidad ovárica y balance energético negativo en la vaca lechera

Cuando el parto ocurre de manera normal, la placenta debe ser expulsada en las primeras 8 horas posparto (Divers & Peek, 2008). En ese momento comienza el puerperio, que se extenderá por definición hasta la aparición del primer celo y ovulación y pueda ser posible

una nueva gestación. Por tanto, para lograr una preñez luego del parto, es necesario la ocurrencia de algunos eventos: involución uterina, regeneración endometrial, reinicio de ciclicidad ovárica, y eliminación de la contaminación bacteriana (Sheldon et al., 2019). Durante la primera semana posparto, el útero se contrae rápidamente y se expulsan los loquios que contienen restos de membranas y fluidos fetales. Seguidamente, entre la segunda y cuarta semana, cualquier tejido endometrial dañado se regenera, se desarrolla una onda de folículos ováricos, selección del folículo dominante y la secreción de estradiol, conduciendo a la ovulación y la formación de un cuerpo lúteo. Con el éxito de estos eventos se da el reinicio de los ciclos ováricos, que puede ocurrir entre la segunda y tercera semana posparto (Sheldon et al., 2009; Crowe et al., 2014). Al final de estas 4 semanas el útero alcanza su tamaño definitivo, pero puede tardar hasta 6 semanas en reestablecerse histológicamente y ser capaz de mantener y desarrollar una nueva gestación (Sheldon et al., 2009). Sin embargo, la duración del puerperio puede variar según condiciones fisiológicas de edad, número de partos, raza o biotipo, severidad del BEN y por condiciones patológicas del parto con necesidad de asistencia (distocia, gestación múltiple, aborto, mortinato o prematuro, y retención de placenta) (Lucy, 2001; Buso et al., 2018).

El estatus endócrino y metabólico de las vacas alrededor del parto es un factor crítico que puede afectar la salud reproductiva (LeBlanc, 2012) mediante dos rutas: una directamente por retrasar la ovulación a causa de que no se reestablece la funcionalidad endócrina del eje hipotálamo- hipófisis- ovario; pero se mantiene el estado de salud de la vaca (Beam & Butler, 1998); la otra ruta ocurre como consecuencia del BEN y del estrés metabólico que la vaca padece en ese período, por lo cual sufre un desequilibrio en el estado de salud (Curtis et al., 1985).

Durante la primera semana posparto se pueden ver los patrones de dominancia y regresión folicular (Savio et al., 1990). Según variaciones individuales y estatus nutricional ese estado fisiológico de anestro posparto puede durar normalmente 2 a 4 semanas y está caracterizado por bajos niveles de progesterona, ya que ocurrió lisis del cuerpo lúteo gestacional, y baja concentración de estrógenos, por el escaso desarrollo folicular (Risco et al., 1994). Los bajos niveles de estrógenos en ausencia de progesterona son la señal para que el hipotálamo secrete hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), quien controla la liberación hipofisaria de hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH); que a su vez son las principales estimulantes del desarrollo folicular y finalmente la ovulación (Lucy, 2003). Este eje endócrino, es influenciado por factores metabólicos que condicionan principalmente la producción de adecuados niveles de LH, necesarios para el desarrollo final del folículo y consecuentemente la ovulación. El enlace entre ambos ejes, metabólico y endócrino se establece entre otros a través de la insulina y del IGF-I (Meikle et al., 2018). En ese sentido, se observa una estrecha asociación entre los días a la primera ovulación, la duración del BEN y la concentración plasmática de IGF-I (Beam & Butler, 1997). Por tanto, las alteraciones metabólicas causadas principalmente por consumo reducido de alimento posparto exacerbaban el BEN, causando

cambios en la secreción de hormonas metabólicas, como la insulina y el IGF-I, y otros factores de crecimiento folicular (Butler, 2003; Kawashima et al., 2007).

Cuando ocurre un desbalance del eje endocrino-metabólico, la dominancia folicular se ve alterada porque la secreción de inhibina se reduce y la de FSH aumenta, lo que favorece la presencia de folículos anovulatorios y quistes foliculares (Roche et al., 2000). La presencia de estos folículos quísticos puede tener como consecuencia un retraso de 6 a 11 días para el primer servicio, y 20 a 30 días para la concepción (Fourichon et al., 2000).

En los casos que ocurre la ovulación, los cuerpos lúteos formados a partir de esos folículos también serán de menor calidad, aumentando el riesgo de pérdida embrionaria (Roche et al., 2000; Williams et al., 2007). Las diferencias en la duración del anestro posparto, la evolución de la condición corporal, y de perfiles metabólicos se han descrito claramente para diferentes categorías (primíparas y multíparas) y para diferentes planos nutricionales en condiciones pastoriles, donde las primíparas tienen un BEN más prolongado y más profundo, y por tanto, mayor intervalo parto a primera ovulación, ya que aún tienen requerimientos de crecimiento (Meikle et al., 2004; Cavestany et al., 2005; Mendoza et al., 2008; Adrien et al., 2012; Meikle et al., 2013).

1.2 Balance energético negativo, funcionamiento del sistema inmune y enfermedad

Cuando el BEN se acentúa a niveles patológicos o se presentan otras patologías como desbalance mineral, se pueden comprometer mecanismos inmunes que dejan a la vaca más susceptible a enfermedades infecciosas tanto del tracto reproductivo como fuera del mismo. La excesiva movilización de tejido adiposo, reflejada en concentraciones elevadas de Ácidos Grasos No Esterificados (NEFA) en suero, puede tener efectos directos sobre la función de las células inmunitarias (Scalia et al., 2006; Ster et al., 2012); específicamente, disminuyendo la actividad mieloperoxidasa de los polimorfonucleares (PMN; Hammon et al., 2006). Esto se ha asociado con un mayor riesgo de enfermedad clínica, ya que los PMN son la primera línea de defensa contra las infecciones (Sordillo & Aitken, 2009). Cuando la concentración de NEFA pasa de 0.3 mmol/L entre 1 a 2 semanas antes del parto, existe un mayor riesgo de retención de placenta, metritis (Chapinal et al., 2011) y/o desplazamiento de abomaso, y en las 2 semanas posteriores al parto las vacas presentan mayor riesgo de metritis cuando la concentración de NEFA está > 0.6 mmol/L en el suero (Ospina et al., 2010a).

Como consecuencia de la lipomovilización excesiva, el β - hidroxibutirato (BHB) aumenta su concentración en la circulación sanguínea (LeBlanc et al., 2005). Cuando el BHB en suero llega en >1.2–1.4 mmol/L en la primera o segunda semana después del parto, hay un riesgo tres veces mayor de ocurrencia de endometritis (Cheong et al., 2011), metritis (Hammon et al. 2006) y mastitis clínica (Duffield et al., 2009; Dubuc et al., 2010; Galvão et al., 2010), siendo considerado un marcador para el diagnóstico de cetosis. Los

cuerpos cetónicos pueden reducir el estallido oxidativo (Hoeben et al., 1997) y alterar la migración quimiotáctica de los PMN (Suriyasathaporn et al., 2000). Por tanto, se observa una asociación entre vacas con BEN más profundo, presencia de metritis y menor reserva de glucógeno en los PMN (Galvão et al., 2010).

La resistencia a la insulina es directamente inducida por señales inflamatorias; cuando este mecanismo se exagera en vacas en transición, puede provocar la movilización de reservas lipídicas, afectando la salud metabólica (Bradford et al., 2015). Por lo tanto, una de las consecuencias es la insuficiencia de la función inmune, que puede alterar el número de leucocitos circulantes (incluidos los PMN) maduros e inmaduros) en el momento del parto o en el posparto temprano y la capacidad lítica de los PMN uterinos (Zerbe et al., 2000). Este puede ser uno de los mecanismos responsables de la mayor susceptibilidad de las vacas a las infecciones locales y sistémicas durante el período posparto.

Vacas que presentan un BEN leve a moderado, basado en los valores de NEFA, BHB y estado corporal, pueden presentar retención de placenta, metritis y/o mastitis en las primeras semanas posparto. Sin embargo, concentraciones de albúmina y colesterol al parto se presentan como marcadores más sensibles y complementarios para NEFA y BHB en la predicción de ocurrencia de metritis (Rupprechter et al., 2018). La albúmina por ser producida en el hígado, cuando éste sufre algún trastorno metabólico o alta demanda de síntesis, en consecuencia disminuye la síntesis de albúmina (Souza et al., 2010). Por eso durante el periodo de transición, la medición de albúmina en el suero puede ayudar a predecir vacas con endometritis (LeBlanc, 2012), con particulares diferencias entre multíparas y primíparas (Rupprechter et al., 2018).

El desbalance mineral, principalmente hipocalcemia, puede ser la puerta de entrada para otras patologías del posparto temprano (Curtis et al., 1985; Gröhn et al., 1990), por eso el nivel de calcio en sangre podría usarse como marcador biológico de salud en el periparto. Prácticamente todas las vacas presentan cierto grado de hipocalcemia al parto y hasta 3 días después, mayormente en multíparas (Rupprechter et al., 2018). Concentraciones séricas de calcio < 2.2 mmol/L en la semana después del parto, a pesar de estar dentro del rango para las vacas sanas, están asociadas con desplazamiento de abomaso, reducción de 3 kg de leche por día en la lactancia temprana y disminución leve en la tasa de concepción en la primera inseminación (Chapinal et al., 2011; Chapinal et al., 2012). Además, el diagnóstico de hipocalcemia clínica una semana antes del parto está asociado con mayor prevalencia de descarga vaginal purulenta (Whiteford & Sheldon, 2005) y metritis posparto (Martínez et al., 2012). La disminución del calcio intracelular puede causar una alteración en las células mononucleares de sangre periférica (Kimura et al., 2006), llevando a un mayor riesgo de ocurrencias de enfermedades infecciosas posparto, como metritis o mastitis (Reinhardt et al., 2011).

1.3 Infección uterina, inflamación y marcadores biológicos

El mecanismo de adaptación a los cambios abruptos que acontecen durante el posparto temprano en el metabolismo de los diferentes tejidos y órganos (algunos anabólicos y otros catabólicos), y en la comunicación endócrina entre ellos, puede darse por una respuesta inmunológica subaguda, donde diferentes marcadores inflamatorios pueden estar alterados, sin que eso sea indicativo de enfermedad (Bradford et al., 2015). En ese período, el útero está en involución, regeneración y descontaminación, pero muy propenso a sufrir infecciones agudas por estar inmunológicamente vulnerable (Singh et al., 2008).

Similar a lo que ocurre en humanos (Steel et al., 2005; Aagaard et al., 2014), existe una flora bacteriana en el útero de vacas gestantes (Karstrup et al., 2017). Aunque la carga bacteriana es muy baja, el útero preñado no puede considerarse un ambiente estéril. La flora bacteriana contiene especies patógenas oportunistas como *F. necrophorum*, *P. levii* y *T. pyogenes*; cuando están presentes, las bacterias se localizan en el endometrio, en la superficie endometrial o en el estroma caruncular (Karstrup et al., 2017). Independientemente de la fuente de microorganismos, más del 90 % de las vacas tienen algún grado de contaminación bacteriana entre los 10 y 14 días posparto, disminuyendo a 78 % en los días 16 a 30, 50 % en los días 31 a 45, y 9 % en los días 46 a 60 posparto (Griffin et al., 1974). Varias son las especies de bacterias patógenas u oportunistas que pueden colonizar el útero luego del parto (McDougall et al., 2011; Carneiro et al., 2016), pero la infección bacteriana con *E. coli* precede a la infección con otros microbios que alteran la estructura y función del endometrio (Sheldon et al., 2009). En este sentido, al comparar vacas sanas y enfermas a los 34 días posparto, se observa una diferencia en el tipo de bacterias presentes en el útero (Santos & Bicalho, 2012). Sin embargo, no sólo es importante la población bacteriana, el desarrollo de la enfermedad clínica depende del equilibrio entre la inmunidad de la vaca y la patogenicidad de las bacterias (Sheldon et al., 2020), sumado a la presencia de factores de riesgo como la retención de placenta, distocia, partos gemelares y la muerte fetal (Grohn & Rajala-Schultz, 2000; Kim & Kang, 2003).

La persistencia de la infección bacteriana puede causar enfermedades uterinas, provocando inflamación y lesiones histológicas del endometrio (LeBlanc et al., 2002). La descarga vaginal purulenta es indicativa de esa infección, su presencia a los 21 días posparto se ha asociado con retraso de la involución del uterina (Sheldon et al., 2000) y con diámetro del cuerno uterino aumentado hasta los 81 días posparto (Baez et al., 2016). Específicamente las bacterias Gram negativas por ejemplo *Escherichia coli* poseen lipopolisacáridos (LPS) en su pared, que en contacto con el complejo receptor (TLR4 – CD14) de las células endometriales (Herath et al., 2006) son el estímulo para que éstas liberen interleuquinas y quimocinas, que serán a su vez, la señal quimiotáctica para que células del sistema inmune innato (PMN, macrófagos y mastocitos) lleguen desde la sangre al tejido infectado, en este caso el endometrio (Akira et al., 2006). Esta respuesta en cadena determina la llegada de estas células al endometrio. El endometrio produce un

exudado hacia la luz conteniendo células inflamatorias, detritos epiteliales, y bacterias fagocitadas, lo que conforma la descarga vaginal purulenta característica de las infecciones uterinas (Williams et al., 2005). Paralelamente las células que están controlando la infección, principalmente los macrófagos, desencadenan una cascada inflamatoria produciendo histaminas e interleuquinas (IL1, IL6 y TNF α), lo que activa sistemas enzimáticos que llevarán a la producción de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos a partir del ácido araquidónico (Ishikawa et al., 2004). Se propone además, que la IL6 medida en el parto, podría ser un predictor de enfermedades reproductivas posparto (Ishikawa et al., 2004). Altas concentraciones de IL6 o TNF α estimulan entre otras cosas, la síntesis de haptoglobina, una proteína de fase aguda producida principalmente por el hígado, y que está asociada con varias afecciones inflamatorias y patológicas en vacas; estando directamente relacionado el aumento de la haptoglobina sérica con el crecimiento bacteriano uterino (Sheldon et al., 2001), descarga vaginal purulenta, endometritis (Burke et al., 2010; Dubuc et al., 2010; Galvão et al., 2010) y mayor riesgo de metritis (Huzzey et al., 2009).

Las prostaglandinas también pueden ser sintetizadas en respuesta directa a LPS (Herath et al., 2006). Estudios *in vitro* demuestran que las células epiteliales del endometrio producen mayormente prostaglandina F2 α (PGF2 α), y células del estroma endometrial producen mayormente prostaglandina E (PGE) (Asselin et al., 1996). Ambas cumplen un rol clave, principalmente la PGF2 α , estimulando la fagocitosis, producción de interleuquinas, y aumentando la permeabilidad vascular, e indirectamente actúa como inmunoestimulante, ya que contrarresta la acción inmunosupresora de la progesterona (P4) (Madsen et al., 2002; Singh et al., 2008). Por otro lado, la producción de prostaglandinas en respuesta a LPS, puede ser disminuida por la presencia de P4 *in vitro* (Asselin et al., 1996; Herath et al., 2006), e *in vivo* en el útero de ovejas (Lewis, 2003). Además la elevada producción de PGE, PGF2 α y la relación PGE:PGF2 α , tiene efectos endócrinos sobre la vida del cuerpo lúteo (Opsomer et al., 2000).

Otra hormona esteroidea además de la P4, que tiene efecto sobre el sistema inmune es el 17 β - estradiol (E2). Por un lado se conocen los efectos inhibitorios *in vitro* del E2 sobre la quimiotaxis en PMN humanos (Ito et al., 1995), y sobre la diapédesis y viabilidad en PMN bovinos (Lamote et al., 2004). Los PMN de vacas en parto presentan receptores para E2, sin diferencia entre pre y parto, y sin efecto de las cambiantes concentraciones de P4 y E2 en plasma, alrededor del parto (Lamote et al., 2006). Sin embargo, no está aclarado que esta hormona pueda tener un efecto directo sobre el control de la infección uterina posparto (Sheldon et al., 2004), sino que más bien hay evidencia de que la infección bacteriana tiene influencia negativa sobre el crecimiento folicular y producción de E2 (Williams et al., 2007).

Un importante metabolito que se ha descrito como modulador de la respuesta inmune es el factor de crecimiento insulino-símil (IGF-I), se encuentra en bajas concentraciones plasmáticas al momento del parto, por su funciones anabólicas similares a la insulina, se ha relacionado con desempeño reproductivo (Meikle et al., 2004), reinicio de ciclicidad

posparto (Cavestany et al., 2009) y con susceptibilidad a enfermedades posparto (Kulcsar et al., 2005; Vangroenweghe et al., 2005; Valdmann et al., 2018). También la asociación entre la expresión génica de IGF-I uterino, balance energético y ambiente uterino para el desarrollo del embrión han sido establecidas en el periparto (Llewellyn et al., 2008; Astessiano et al., 2017). A través del estudio de enfermedades tumorales se ha puesto en evidencia como el IGF-I estimula la producción de IL8 (Kooijman et al., 2003), una interleuquina con gran potencia quimiotáctica (Zerbe et al., 2003). Por lo tanto, los marcadores metabólicos son importantes indicadores que corroboran en las medidas de prevención de infecciones uterinas, direccionando para mantener un estatus inmunitario competente durante el período de transición.

1.4 Procesos inflamatorios y su asociación con la irrigación sanguínea ovárica y uterina

Cuando existen disturbios puerperales, la liberación y metabolización de la prostaglandina se altera (Slama et al., 1994), causando cambios en el flujo sanguíneo uterino (Herzog & Bollwein, 2007), con posibles efectos secundarios en el flujo sanguíneo del ovario. La ecografía viene siendo empleada para mejorar y ayudar en el diagnóstico precoz de la endometritis (Heppelmann et al., 2013a; Debertolis et al., 2016) y conocer los efectos de la enfermedad sobre la performance reproductiva (Strüve et al., 2013; Lee et al., 2018). En este sentido, estudios sobre el suministro de sangre al útero a través de la arteria uterina han demostrado que el volumen de flujo sanguíneo es mayor cuando existe metritis o endometritis, tanto de manera natural (Heppelmann et al., 2013b; Bollwein & Heppelmann, 2016) o inducida experimentalmente (Debertolis et al., 2016). También se ha demostrado un retraso en la involución del tamaño uterino, visto como un mayor diámetro del cuerno uterino en vacas con metritis comparadas con vacas sanas a los mismo días posparto (Heppelmann, et al., 2013b). Sin embargo, la relación entre los hallazgos ecográficos, la citología uterina y el flujo sanguíneo del tracto reproductivo no están claramente demostrados.

1.5 Consecuencias de las infecciones uterinas sobre el eje reproductivo.

En tanto la infección retrasa la involución uterina, también tiene un efecto negativo sobre la selección y crecimiento del folículo dominante, pero no sobre la emergencia de la onda folicular (Sheldon et al., 2002). A pesar de que existe circulación de endotoxinas en sangre desde el parto, esto no tendría efecto sobre el estatus ovárico posparto; el efecto negativo estaría determinado por la presencia de endotoxinas en el ambiente intrafolicular (Cheong et al., 2017). Esto afecta la calidad del ovocito, la integridad de las células de la granulosa y la producción de estradiol; además de que cuando la ovulación ocurre, el cuerpo lúteo es de menor tamaño y secreta menos progesterona (Williams et al., 2007). Los efectos negativos de la infección uterina sobre la funcionalidad ovárica están

íntimamente relacionados con los animales que presentan descarga vaginal anormal; en general, estos animales tienen una reanudación retardada de los ciclos ováricos posparto (anestro anovulatorio o fases luteales prolongadas) cuando comparados con los animales sin infección uterina (Opsomer et al., 2000).

Las infecciones uterinas diagnosticadas clínicamente por la descarga vaginal a partir de los 21 días posparto (endometritis) están asociadas con el aumento del intervalo parto-primer servicio, y disminución de la tasa de concepción en el primer servicio (Walsh et al., 2011). Este retraso en la primera inseminación tiene como consecuencia un aumento hasta 30 días del intervalo parto-concepción, y una disminución del 20 % en el porcentaje de concepción, aumentando en consecuencia un 3% el riesgo de descarte por falla reproductiva (LeBlanc et al., 2002). Las infecciones uterinas diagnosticadas hasta 10 días posparto (metritis) también tienen consecuencias similares, retrasando 7 días el primer servicio, y disminuyendo un 20% la tasa de concepción al primer servicio, lo que da como resultado 19 días de aumento en el intervalo parto-concepción (Fourichon; et al., 2009). Vacas que no presentan descarga vaginal purulenta, pero tienen citología aumentada (endometritis subclínica), también tardan más tiempo en concebir y el riesgo de preñez fue 0.69 cuando el diagnóstico subclínico fue entre 20 y 33 días posparto, y 0.59 cuando el diagnóstico fue entre los 30 y 47 días posparto, por tanto la tasa de preñez es aproximadamente la mitad que en vacas sanas (Kasimanickam et al., 2004).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para Uruguay el sector lácteo es una de las principales fuentes de ingreso por exportaciones de productos, estando en cuarto lugar y representando el 9 % de las exportaciones de bienes (DIEA- MGAP, 2019). Desde el sector primario hay desafíos que se pueden afrontar mediante la mejora de procesos productivos, y uno de los más importantes son la salud y bienestar animal, entre otros (Fariña & Chilbroste, 2019). El período de transición en la vaca lechera es donde ocurre la mayoría de los problemas de salud, y uno de los principales son las enfermedades uterinas (Sheldon et al., 2019). Las pérdidas económicas que ocurren como consecuencia de las enfermedades uterinas, se adjudican a: menos producción de leche, mayor uso de medicamentos, tiempo dedicado al tratamiento, tarifa veterinaria y reemplazo de animales (Drillich et al., 2001; Liang et al., 2017). Las pérdidas ocasionadas dependen del manejo de rodeo, toma de decisiones de tratamiento y del potencial productivo de los animales.

En la etapa del periparto, la interrelación del eje endócrino-reproductivo con el eje somatotrófico y el sistema inmune juegan un rol clave en la salud general y salud reproductiva de la vaca (Bradford et al., 2015; Pascottini & LeBlanc, 2020). Todo conocimiento que se aporte a ese complejo sistema es necesario para trabajar en salud preventiva. La etapa del periparto es el periodo de mayor desbalance metabólico que puede existir en un sistema pastoril (Meikle et al., 2013) y eso puede llevar a mayor riesgo de ocurrencia de enfermedades uterinas asociado a mayor BEN (Giuliodori et al., 2017). Sin embargo, en la mayoría de los tambos de Uruguay las infecciones uterinas son subestimadas por tener en cuenta solamente los casos graves y mas evidentes (casos clinicos agudos y con necesidad de tratamiento inmediato). Por lo tanto, es de gran importancia para el sector lechero conocer el impacto de las infecciones uterinas leves y moderadas en los sistemas pastoriles sobre la producción de leche, la fisiología reproductiva y su asociación con marcadores inflamatorios y metabólicos. Más aún, dada la información disponible respecto una mayor incidencia de infecciones uterinas en vacas primíparas asociadas al parto (Giuliodori et al. 2013; 2017) y teniendo en cuenta lo que implica esta categoría en el futuro del predio, es que utilizamos este modelo experimental.

Con ese fin, planteamos un estudio prospectivo con vacas Holstein primíparas, haciendo un seguimiento desde el parto hasta el fin del período de espera voluntario (43 DPP) para evaluar, de manera retrospectiva, la involución uterina, marcadores metabólicos e inflamatorios, y desempeño productivo entre las vacas sanas y las vacas que desarrollan naturalmente infecciones uterinas leves o moderadas, sin síntomas sistémicos.

3. HIPÓTESIS

Las infecciones uterinas (metritis y endometritis clínica) no acompañadas por sintomatología grave (fiebre, depresión) impactan sobre la producción de leche y afectan la recuperación del eje reproductivo durante el posparto y se asocian con marcadores inflamatorios y metabólicos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar los efectos de infecciones uterinas puerperales sobre características anatómicas y fisiológicas del útero y ovarios durante los primeros 45 días posparto, y su relación con parámetros productivos, metabólicos e inmunológicos.

4.2. Objetivos específicos

- 1) Determinar la presencia y grado de la enfermedad uterina.
- 2) Medir el diámetro del cuerno uterino, espesor del endometrio y diámetro de arterias uterinas.
- 3) Evaluar la cantidad total de folículos antrales, el diámetro del folículo dominante y flujo sanguíneo del folículo dominante.
- 4) Evaluar indicadores sanguíneos estratégicos relacionados con el balance energético y enfermedad posparto.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. *Vacas y diseño experimental*

El experimento fue realizado entre marzo y junio de 2019, en el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) en la Estación Experimental La Estanzuela, Colonia, Uruguay (34° 27' S, 57° 50' W). Se utilizaron vacas lecheras Holstein primíparas (n = 36) seleccionadas con base en los factores de inclusión: época de parto, edad, y ECC a los -8 días preparto de 3.25 (rango: 2.75- 3.25, en escala de 1 - 5 (Edmonson et al., 1989)). Se excluyeron seis vacas que presentaron otras patologías como mastitis, cojeras u otras. Fueron seleccionados aleatoriamente, en grupos del máximo 5 animales por día para la fecha del parto (considerando un intervalo de ± 1 día), y el peso corporal posparto 501 ± 4.9 Kg.

La alimentación preparto, desde el día -30 del parto, consistió en ración totalmente mezclada (**Cuadro I**) sin acceso a pastura y con agua *ad libitum*, buscando suministrar el 100 % de los requerimientos de energía neta para lactancia y proteína metabolizable predichos por el NRC (2001) en base a las características promedio del lote. La ración totalmente mezclada incluyó sales aniónicas, por lo que semanalmente se monitoreaba el pH de orina. La ración totalmente mezclada se suministró 1 vez al día, a las 17:00 horas, en comederos grupales solamente para vaquillonas. Se realizó atención al parto las 24 horas en todos los días de la semana (**Anexo I**, ficha de monitoreo de parto).

Cuadro I. Ingredientes de ración totalmente mezclada preparto.

Ingrediente	% de materia seca
Ensilaje de maíz	41,7
Paja de cebada	33,4
Harina de soja	12,5
Grano húmedo de maíz	7,3
Urea	0,8
Carbonato de calcio	0,9
Óxido de magnesio	0,8
Sales preparto	2,5

Al inicio de lactancia los animales estuvieron en doble turno de pastoreo (*Festuca arundinacea*, y mezclas de *Medicago sativa* y *Dactylis glomerata*), y recibieron concentrado en la sala de ordeño. El aporte de pastura se determinó en base a la tasa de crecimiento semanal en la plataforma de pastoreo según lo propuesto por Fariña (2017). El ordeño de la mañana se realizaba a las 05:00 horas y luego comenzaba el primer turno

de pastoreo, el segundo ordeño se realizaba a las 15 horas y luego comenzaba el segundo turno de pastoreo. Los animales caminaban en promedio 800 metros por día y en todo momento tenían agua disponible. La participación del concentrado en la dieta se asignó según el momento de la lactancia en base a los requerimientos del NRC (2001). Las reservas de ensilaje de maíz se suministraron puntualmente, solo cuando el pasto y el concentrado no alcanzaron a cubrir los requerimientos (NRC, 2001).

El protocolo utilizado en el diseño experimental para la colecta de muestras para todos los animales se dio de la siguiente forma (**Figura 1**): al día -8 preparto, se colectó sangre para posterior análisis de albúmina y haptoglobina, NEFA y BHB. Realizando luego el control de parto y monitoreo para la expulsión de placenta. Se consideró parto distócico cualquier tipo de asistencia al parto, mellizos, prematuro, mortinato; y placenta retenida cuando 12 horas después del parto aún no se expulsó la placenta (LeBlanc, 2008). Luego se realizaron 6 evaluaciones, semanalmente, en los días 9, 15, 22, 29, 36 y 43 posparto. En cada evaluación se realizó la verificación de la temperatura corporal, vaginoscopia, ecografía modo B del útero y ovarios, ecografía Doppler del folículo dominante, citología endometrial y una muestra de sangre. Diariamente, se colectaron datos de producción de leche. El peso vivo fue registrado automáticamente a la salida del tambo y para cada vaca se hizo un promedio de peso por semana.

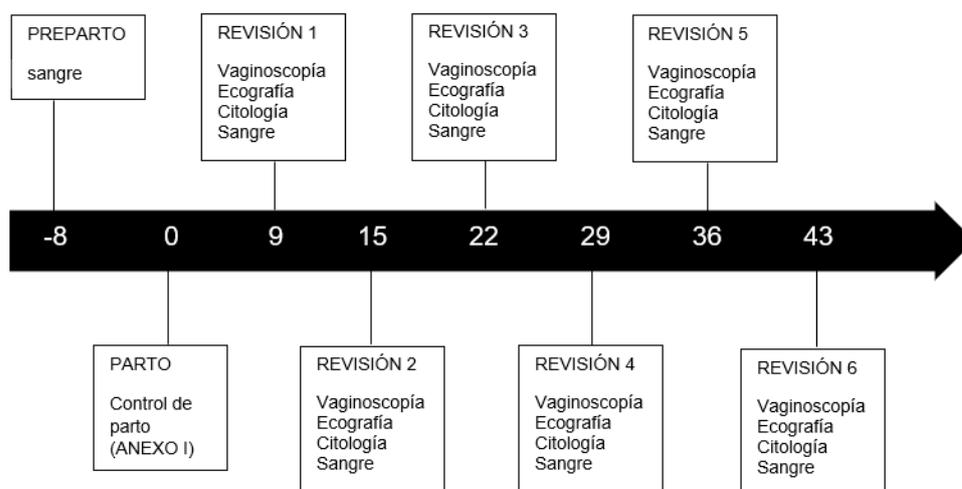


Figura 1. Diseño experimental, consistió en un período desde 8 días antes del parto hasta 43 días posparto (DPP) para realización de evaluaciones ecográficas, vaginoscopia y colecta de muestras de sangre y uterina (citología).

5.2. Exámenes clínicos

En todos los días de evaluación clínica posparto, la temperatura rectal fue registrada con termómetro digital. Para el examen vaginoscópico, se limpió la vulva con toalla de papel y se introdujo el vaginoscopio desinfectado, con la ayuda de una fuente de luz se caracterizó la descarga vaginal según la clasificación de Sheldon et al. (2009): en escala de 0 a 3 (0 = moco traslucido, 1 = moco \leq 50 % de exudado purulento, 2 = moco con \geq

de 50 % de exudado purulento y 3 = completamente purulento con olor o hemorrágico). También se utilizaron los siguientes criterios: si al día 9 o 15 posparto se presentó descarga grado 2 o 3 sin fiebre, pérdida de apetito u otro signo sistémico, se clasificó como metritis clínica grado 1. Si en los mismos días y mismo tipo de descarga vaginal se acompañó con fiebre y otros síntomas sistémicos, se clasificó como metritis clínica grado 2. Estos casos graves y con necesidad de tratamiento se tomaron en cuenta para calcular la incidencia de las patologías, pero fueron excluidos ya que no integraban la hipótesis del trabajo. Si al día 22 o posterior presentó una descarga vaginal grado 2 o 3 se clasificó como endometritis clínica. También se registró la presencia o ausencia de olor y color del cérvix (normal o congestivo). Las vacas clasificadas como metritis clínica grado 1 y endometritis clínica fueron analizadas como único grupo, llamado grupo enfermo o grupo con infección uterina, para diferenciarlo del grupo sano.

5.3. Exámenes ecográficos

Se realizaron ecografías en modo B y Doppler de ovarios y en modo B de útero en las vacas todos los días de evaluación clínica (9, 15, 22, 29, 36 y 43 días posparto) utilizando un equipo portátil (Sonoscape S9V Bedford Hill, NY, USA) conectado a una sonda transrectal lineal de 5.0-10.0 MHz / 46 mm, y manteniendo constante los ajustes de frecuencia y ganancia (110 para modo B y 28 para modo Doppler color) durante todo el estudio. Todas las mediciones fueron realizadas por el mismo operador.

5.3.1. Útero

Para cada cuerno uterino, se midió y registró el diámetro en la curvatura mayor del útero tomando una imagen de un corte transversal; el diámetro fue el resultado del promedio de dos medidas perpendiculares entre sí. Esta misma imagen fue utilizada para medir el espesor del endometrio a través del promedio de tres mediciones en diferentes puntos de cada imagen. También se midió el diámetro de ambas arterias uterinas según lo descrito por Bollwein et al. (2000).

5.3.2. Ovarios

Los ovarios fueron completamente escaneados para realizar el conteo total de los folículos mayores de 4 mm y medición de los folículos mayores de 10 mm, registrados en videos. En modo Doppler color, se realizó la evaluación subjetiva del porcentaje de flujo sanguíneo de la pared folicular y se guardó un video para posterior evaluación objetiva con auxilio del software imageJ software (versión 1.50f) de acuerdo con metodología previamente descrita (de Tarso et al., 2016). Cuando un cuerpo lúteo estaba presente, se registró su diámetro.

5.4. Citología uterina

Las muestras para citología endometrial se realizaron a los 9, 15, 22, 29, 36 y 43 días posparto utilizando la técnica descrita por Kasimanickam et al. (2004). Brevemente, se

adaptó el cytobrush para el uso en bovinos, se cortó 10 cm de longitud, se insertó una varilla de acero inoxidable de 55 cm de largo y se colocó dentro de un tubo de acero inoxidable de 5 mm de diámetro y 50 cm de largo, de manera que el cepillo quedaba oculto. Se recubrió con camisa sanitaria plástica para evitar la contaminación vaginal. La región perineal y vulva se limpió con toalla de papel y se desinfectó con solución yodada, se introdujo el dispositivo con el cepillo a través de la vagina con la ayuda de la otra mano a través de recto para fijar el cérvix. Al llegar al orificio cervical se puncionó la camisa sanitaria y se continuó a través de cérvix hasta llegar a la curvatura mayor del cuerno uterino que gestó, en ese punto se exteriorizó el cepillo en la luz uterina y con la ayuda de la mano a través del recto se puso en contacto el cepillo con la pared endometrial, se giró tres veces en sentido horario, luego se ocultó el cepillo nuevamente en el tubo de acero inoxidable para retirarlo. La lámina portaobjeto identificada se preparó en el momento, haciendo rodar el cepillo sobre la lámina, y dejando secar al aire. Luego se utilizó un kit de tinción rápida, para fijar y teñir las células en tres pasos (Diff-Quick, RAL Diagnostic, Francia). El porcentaje de neutrófilos se determinó en base al conteo de 200 células nucleadas por cada lámina, utilizando microscopio Primo Star (Carl Zeiss Microscopy, White Plains, NY, USA) con 40 × aumentos.

5.5. *Colectas de sangre*

La sangre fue colectada por venopunción coccígea utilizando tubos SST con activador de coágulo (16 x 100 mm, 8.5 mL; BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, USA) y centrifugadas a 2500 rpm durante 10 minutos. De cada tubo se obtuvieron dos muestras de suero que fueron guardadas a -20°C para posterior análisis.

5.5.1. *Perfil metabólico y hormonal*

Las concentraciones sanguíneas de NEFA, BHB, Albúmina, Calcio, Insulina e IGF-1, progesterona y haptoglobina se determinaron en Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay. NEFA, BHB, albúmina y haptoglobina se analizaron para los -8 días parto, y para los 9, 15, 22, 29, 36 y 43 DPP. Se utilizaron los siguientes métodos y kits comerciales: para NEFA método enzimático colorimétrico ACS ACOD con reactivo NEFA -HR 2, Wako. Para BHB método cinético enzimático D-3-Hydroxybutyrate con reactivo BHB BioSystem. Para albúmina el método BCG con reactivo Albumina BioSystem; el coeficiente de variación interensayo fue menor a 10% para todos los sueros controles de NEFA, BHB y albúmina. Las concentraciones de haptoglobina se determinaron a través de un kit de Elisa comercial (Tridelta Development LTD, Dublín, Irlanda). La sensibilidad del método es de 0.005 mg/mL. Los coeficientes de variación intraensayo fueron 1.4 % y 1.1 % para los controles 1 (0.35 mg/mL) y 2 (2.27 mg/mL). Los coeficientes de variación interensayo para los mismos controles fueron 6.5 % y 6.6 % respectivamente. Calcio se analizó con el método Arsenazo III con reactivo Calcio BioSystem, el coeficiente de variación interensayo fue 3.31 % y 2.21 % para control 1 (2.2 mmol/L y 3.0 mmol/L) se analizó para los 9, 15, 22, 29, 36 y 43 DPP.

Las concentraciones de IGF-I e insulina en suero se determinaron a los 15, 22 y 29 DPP, a través de ensayo inmunoradiométrico con kits comerciales (IGF1-RIACT Cis Bio International, Gif-Sur-Yvette cedex, France; y insulina DIASource Immuno Assays S.A, Nivelles, Bélgica). El kit para IGF-I contiene dos anticuerpos monoclonales con dos diferentes sitios antigénicos para IGF-I, un anticuerpo está adherido al tubo, el otro está marcado con iodo 125. Las muestras se trataron primero con una solución acídica para desplazar la proteína portadora, que fue luego saturada con IGF-II para evitar una reasociación entre IGF-I y la proteína portadora. La sensibilidad del ensayo fue 0.73 ng/mL. El coeficiente de variación interensayo para el control 1 (44.4 ng/mL) y el control 2 (409.8 ng/mL) fueron 6.7 % y 3.4 % respectivamente. Para insulina, la sensibilidad del ensayo fue 1.47 μ UI/mL. Los coeficientes de variación intraensayo para el control 1 (20,5 μ UI/mL) y el control 2 (72,3 μ UI/mL) fueron 5.77 % y 3.30 % respectivamente.

Las concentraciones de progesterona fueron determinadas por un radioinmunoensayo (RIA) en fase sólida utilizando kits de MP (MP Biomedicals, Solon, OH, USA). La concentración mínima detectable del ensayo fue de 0.025 ng/mL. Los coeficientes de variación intraensayo para el control 1 (0.28 ng/mL), el control 2 (5.04 ng/mL) fueron 12 % y 10 % respectivamente. Luego de determinada la ovulación mediante ecografía y antes de los 7 días se tomó la primera muestra para progesterona, (lo que denominamos semana 1 post ovulación, y luego dos muestreos más, separados de una semana (semana 2 y semana 3 post ovulación).

5.6. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software estadístico R versión 3.0.2 (R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria). El test de Kolmogorov–Smirnov fue utilizado para confirmar distribución normal de los valores y el test de Dixon para detectar valores atípicos. Los datos que presentaron una distribución normal se analizaron mediante el modelo mixto ANOVA para medidas repetidas y las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante la prueba post hoc de Tukey. Los datos que no presentaron una distribución normal se analizaron mediante la prueba de Kruskal Wallis y la prueba de la U de Mann Whitney para comparar los valores medios entre los grupos. Los parámetros de frecuencia fueron sometidos al test de Chi Cuadrado. El reinicio a la ciclicidad ovárica se definió como el día cuando la progesterona fue mayor o igual a 1 ng/mL. La probabilidad de reinicio se estimó con la proporción de vacas a través del Genmod (SAS). Una probabilidad de $P < 0.05$ fue considerada como diferencia significativa. Los datos se presentan como media \pm E.E.M y porcentajes (%).

6. RESULTADOS

6.1. Exámenes clínicos

En el **Cuadro II** se presenta la distribución de vacas que tuvieron trastornos de parto y/o infecciones uterinas (metritis y endometritis). Al parto, 9 vacas (25 %) presentaron algún trastorno, mientras que 27 vacas (75 %) tuvieron parto normal. Las anomalías de parto fueron las siguientes: cinco retenciones de placenta, una distocia, uno prematuro, un parto gemelar, y una vaca con lesión cérvico-vaginal.

De acuerdo con la clasificación de descarga vaginal previamente descrita, durante el posparto 15 vacas (41.7 %) presentaron infección uterina: metritis grado 1 ($n = 7$), metritis grado 2 ($n = 2$) o endometritis ($n = 6$); existiendo 2 vacas que presentaron ambas patologías. Las dos vacas que presentaron metritis clínica grado 2, con síntomas sistémicos y necesitaron tratamiento con antibióticos y antiinflamatorios, son incluidas solamente para el cálculo de incidencia, pero no se incluyeron en los muestreos.

De las vacas sanas, al día 9 solamente 2 presentaban moco traslúcido (score 0) y las otras 19 presentaron descarga vaginal score 1. Al día 15 posparto ya eran 12 las vacas sanas con descarga score 0, y permanecían 9 con score 1. A los 22 y 29 DPP solamente 2 y 1 vacas presentaron score 1, respectivamente.

De las 6 vacas diagnosticadas con endometritis, 3 fueron con descarga vaginal score 2, y 3 con descarga vaginal score 3. De las 9 vacas con metritis, 8 fueron descarga score 3 y una con score 2.

Cuadro II. Descripción de frecuencia de partos con problemas e infecciones uterinas posparto hasta el día 43 posparto, en vacas Holstein primíparas.

	Parto normal	Parto problema	Total
Sanas posparto	18	3	21
Infección posparto	9	6	15
Total	27	9	36

Del total de vacas sanas, 14.3 % presentaron problemas al parto, mientras que el porcentaje de vacas con infección uterina fue de 40 % ($P = 0.078$).

Las vacas fueron diagnosticadas con infecciones uterinas a los 15 DPP). En las vacas que tuvieron parto normal ($n = 9$), la infección uterina fue diagnosticada a los 22 DPP, y en las que tuvieron problemas en el parto ($n = 6$) se diagnosticó a los 9 DPP. El 60 % ($n = 9$) de las vacas enfermas presentaron olor en la descarga vaginal al día del diagnóstico, mientras que el 40 % ($n = 6$) no presentaron olor en ningún día de revisión.

En el momento de diagnóstico, el 80 % de las vacas con infección uterina presentaron cérvix congestivo o hemorrágico ($n = 12$), mientras que en las sanas se observó que el

28.6% presentó cérvix congestivo ($n = 6$) ($P = 0.002$). Este hallazgo en vacas sanas se presentó en una vaca a los 22 DPP, en dos vacas a los 29 DPP, en una vaca a los 36 DPP y en dos vacas a los 43 DPP.

Los valores de P para los efectos fijos de grupo, tiempo y sus interacciones para las variables evaluadas (citología, recuento folicular, diámetro de folículo dominante, flujo sanguíneo del folículo dominante, diámetro del cuerpo lúteo, concentración de progesterona, producción de leche, peso vivo, NEFA, BHB, Albúmina, Haptoglobina, Insulina, IGF- I y Calcio) se detallan en el **Cuadro III**.

Cuadro III. Efectos fijos incluidos en el modelo para los análisis de las siguientes variables: citología, recuento folicular, diámetro de folículo dominante, flujo sanguíneo del folículo dominante, diámetro del cuerpo lúteo, concentración de progesterona, producción de leche, peso vivo, NEFA, BHB, Albúmina, Haptoglobina, Insulina, IGF- I y Calcio. Los efectos fijos son: Grupo(G), Tiempo (T), y sus interacciones (G*T).

	G	T	G*T
Citología (%)	****	***	**
Recuento folicular (N°)	NS	*	NS
Folículo dominante (mm)	0.06	***	NS
Flujo del folículo dominante (%)	NS	NS	NS
Diámetro de CL (mm)	NS	NS	NS
P4 (ng/mL)	NS	NS	NS
Peso vivo (Kg)	****	NS	NS
Leche (L/vaca)	****	****	NS
NEFA (mmol/L)	NS	****	NS
BHB (mmol/L)	**	**	NS
Albúmina (g/L)	****	****	NS
Haptoglobina (mg/mL)	NS	****	NS
Insulina (ng/mL)	NS	NS	NS
IGF- I (ng/mL)	NS	NS	NS
Calcio (mmol/L)	*	NS	NS

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$; NS: no significativo.

6.2. Citología

El recuento de PMN realizado a partir de la toma de muestra con cytobrush, desde la pared endometrial, fue afectado por el grupo ($P < 0.0001$), por el tiempo ($P < 0.001$), y presento interacción grupo * tiempo ($P < 0.01$). El recuento de PMN promedio para todo el periodo evaluado fue mayor en las enfermas (20.4 ± 2.6 %) que en las sanas (7.2 ± 1.1 %). Hubo diferencias entre enfermas y sanas a los 22, 29 y 36 DPP como se muestra en la **Figura 2**. El grupo sano disminuyó el %PMN a valores por debajo del 5 % a los 22

DPP, mientras que el grupo enfermo mantuvo el %PMN mayor de 30 % a los 22 DPP y mayor a 5 % hasta el día 43.

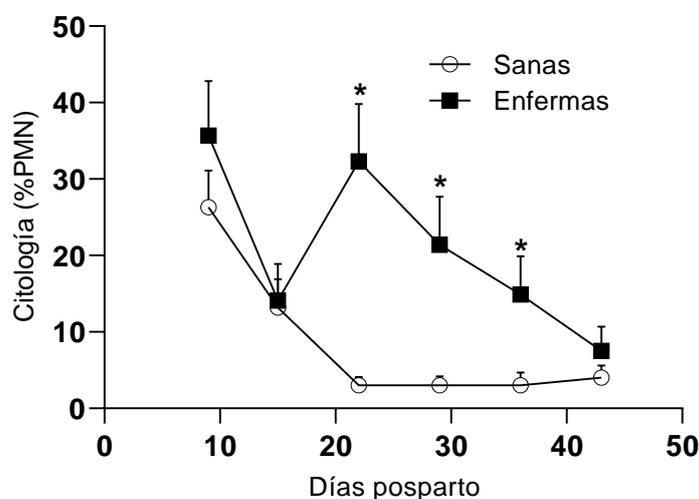


Figura 2. Porcentaje de PMN (promedio \pm E.E.M.) en vacas sanas y con infección uterina en función de los días posparto. *Los valores de % PMN difieren ($P < 0.05$) entre sanas y enfermas para los días posparto identificados.

6.3. Exámenes ecográficos

6.3.1. Útero

El diámetro del cuerno uterino estuvo afectado por el grupo (sanas: 29.2 ± 0.5 mm y enfermas: 31.6 ± 0.5 mm; $P < 0.0001$), por el tiempo ($P < 0.0001$) y presentó interacción grupo * tiempo ($P < 0.001$). El cuerno uterino previamente grávido (31.1 ± 0.5 mm) fue mayor ($P < 0.05$) que el previamente no grávido (29.8 ± 0.5 mm) para todo el periodo evaluado. Entre vacas sanas y enfermas de acuerdo con el cuerno uterino, el cuerno uterino previamente grávido fue mayor ($P < 0.05$) en vacas con infección uterina que en sanas a los 9 y 15 DPP y similar en los otros días evaluados (**Figura 3A**). El diámetro del cuerno uterino previamente no grávido fue mayor ($P < 0.05$) en vacas con infección uterina que en sanas a los 9 y 15 DPP, y similar en los otros días evaluados (**Figura 3B**).

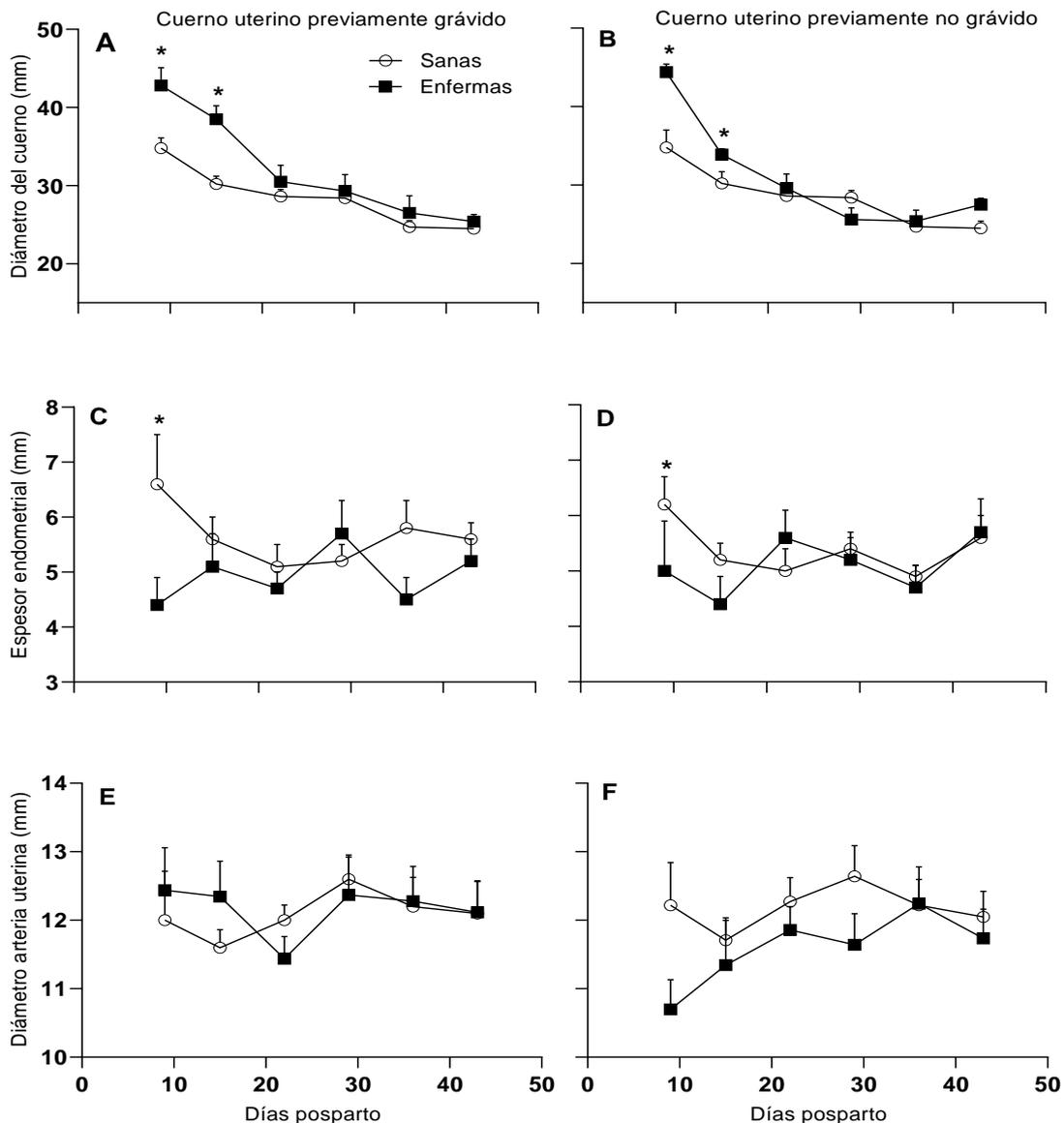


Figura 3. Diámetro de cuerno uterino (**A, B**), espesor endometrial (**C, D**), diámetro de arteria uterina (**E, F**) (mm; promedio \pm E.E.M.) del cuerno previamente grávido (**A, C, E**) y del cuerno previamente no grávido (**B, D, F**) para vacas sanas y con infección uterina en función de los días posparto. *Los valores difieren ($P < 0.05$) entre sanas y enfermas para los días posparto identificados.

El espesor del endometrio fue afectado por el grupo (sanas: 5.5 ± 0.1 mm y enfermas: 5.0 ± 0.2 mm; $P < 0.05$), no fue afectado por el tiempo, ni por el cuerno uterino (previamente grávido vs. previamente no grávido), ni sus interacciones ($P > 0.05$). Las vacas sanas presentaron un mayor espesor de endometrio a los 9 DPP en cuerno uterino previamente grávido (sanas: 6.6 ± 0.4 mm y enfermas 4.3 ± 0.5 mm) (**Figura 3C**) y en el cuerno previamente no grávido (sanas: 6.2 ± 0.4 mm y enfermas: 5.0 ± 0.5 mm) (**Figura 3D**).

El diámetro de la arteria uterina no presentó diferencia entre grupos (sanas: 12.1 ± 0.1 mm y enfermas: 11.9 ± 0.2 mm; $P > 0.05$), tampoco hubo efecto del cuerno uterino

(previamente grávido vs. previamente no grávido), ni del tiempo (día posparto), ni para sus interacciones (**Figura 3E, F**).

6.3.2. Ovarios

El recuento de folículos mayores a 4 mm aumentó a lo largo del tiempo ($P < 0.05$; **Figura 4A**). La cantidad de folículos no fue afectada por el grupo, ni presentó interacción grupo * tiempo. El diámetro del folículo dominante fue afectado por el tiempo ($P < 0.001$; **Figura 4B**). El diámetro tendió a ser afectado por el grupo (sanas: 13.6 ± 0.3 mm y enfermas: 12.5 ± 0.4 mm; $P < 0.06$) y no presentó interacción grupo * tiempo. El porcentaje del flujo sanguíneo del folículo dominante (21.6 ± 7.3 %) no fue afectado por el grupo, por el día, ni por sus interacciones.

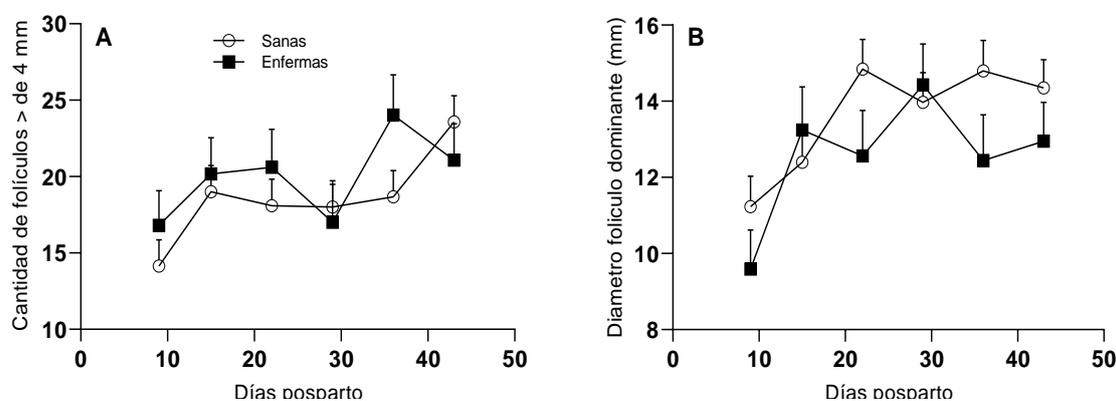


Figura 4. Recuento folicular (A) y diámetro del folículo dominante (B) (mm; promedio \pm E.E.M.) en vacas sanas y enfermas (con infección uterina).

Desde el parto a 43 DPP, 27 vacas ovularon (79.4 %), 18 (85.7 %) del grupo sano y 9 (69.2 %) del grupo enfermo ($P = 0.18$) (**Figura 5**). La mediana para los días de primera ovulación fue a los 22 DPP sin diferencias entre grupos ($P > 0.05$).

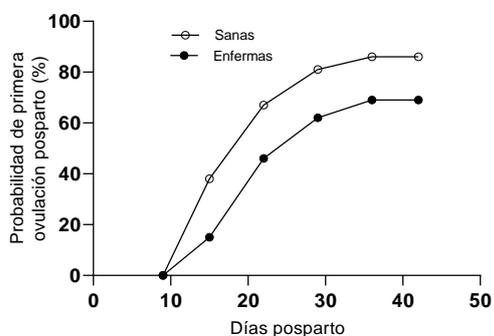


Figura 5. Probabilidad de primera ovulación posparto (%) en vacas sanas y vacas con infección uterina.

El diámetro del CL no fue diferente entre grupos (sanas: 16.4 ± 0.9 mm y enfermas 18.8 ± 1.5 mm). Tampoco presentó diferencias en el tiempo, entre la primera semana de ovulación (17.1 ± 1.2 mm) la segunda (17.3 ± 1.2 mm) y la tercera (18.5 ± 2 mm).

De manera similar la concentración de progesterona no fue diferente entre grupos (sanas: 1.8 ± 0.3 ng/mL y enfermas: 2.6 ± 0.6 ng/mL). Tampoco presentó diferencias en el tiempo, entre la primera semana de ovulación (1.4 ± 0.5 ng/mL) la segunda (2.8 ± 0.5 ng/mL) y la tercera (2.5 ± 0.8 ng/mL). No hubo interacción grupo * tiempo.

6.4. Datos de producción y perfil metabólico

El peso vivo fue afectado por la enfermedad, en sanas fue 494.7 ± 5.5 Kg y en enfermas 473.0 ± 10.5 Kg; $P < 0.0001$). El peso no fue afectado por el tiempo, ni presentó interacción grupo * tiempo (**Figura 6A**). Sobre la producción de leche hubo un efecto de la enfermedad y del tiempo, pero no de sus interacciones. En general, el grupo de vacas enfermas produjo 21.3 ± 0.2 l/día, y las sanas 23.8 ± 0.1 l/día; $P < 0.001$; **Figura 6B**).

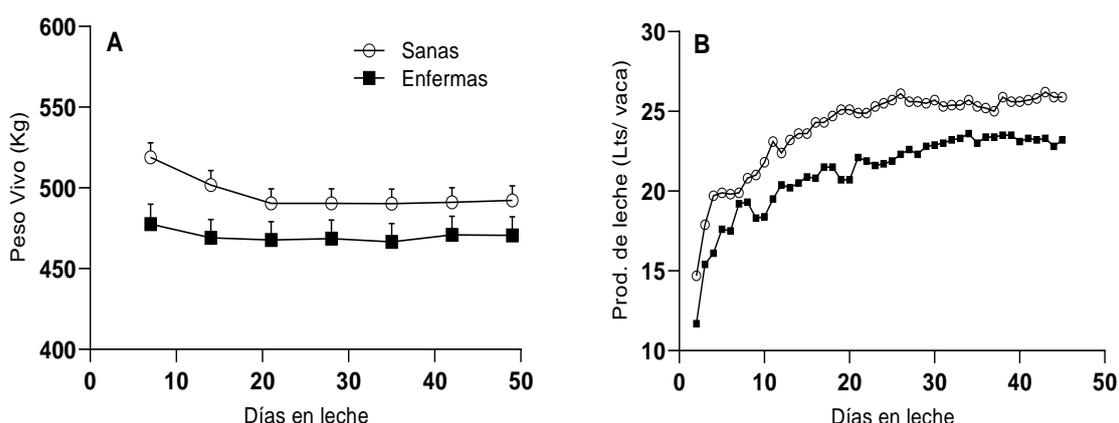


Figura 6. Valores promedios desde el parto a los 45 DPP para (A) Peso vivo semanal (Kg), y (B) producción de leche diaria (l/vaca/día) en vacas sanas y vacas enfermas.

La concentración sérica de NEFA cambió a lo largo del tiempo. Sin embargo, no hubo diferencias entre sanas y enfermas durante el periodo evaluado. En el periodo posparto, la concentración de NEFA a los 9 DPP fue mayor (1.14 ± 0.05 mmol/L que todos los otros días evaluados; $P < 0.001$; **Figura 7A**).

La concentración de BHB fue afectada por el grupo y por el tiempo, pero no por sus interacciones. La concentración promedio de BHB, desde el parto hasta 43 DPP, fue menor en el grupo de vacas enfermas (0.9 ± 0.1 mmol/L) comparado con las sanas (1.0 ± 0.04 g/L). En el periodo preparto, las concentraciones de BHB fueron menores ($P < 0.05$) cuando es comparada con el periodo posparto para los días 9, 15, 22 y 29, independiente de los grupos (**Figura 7B**).

La concentración sérica de albúmina fue afectada por el grupo y por el tiempo, pero no hubo interacciones grupo * tiempo. La concentración promedio de albúmina, desde el parto hasta 43 DPP, fue menor en el grupo de vacas enfermas (31.6 ± 0.6 g/L) comparado con las sanas (34.3 ± 1.1 g/L; $P < 0.0001$; **Figura 7C**).

La concentración de haptoglobina solamente fue afectada por el tiempo. En el parto y a los 9 DPP, la concentración de haptoglobina fue mayor que el periodo posparto para los días 22, 29, 36 y 43, independiente de los grupos. Cuando analizado aisladamente entre sanas y enfermas para el periodo preparto, las vacas enfermas presentan mayor ($P < 0.01$) concentración de haptoglobina que las vacas sanas. En el periodo posparto, no hubo diferencia entre los días y los grupos (**Figura 7D**).

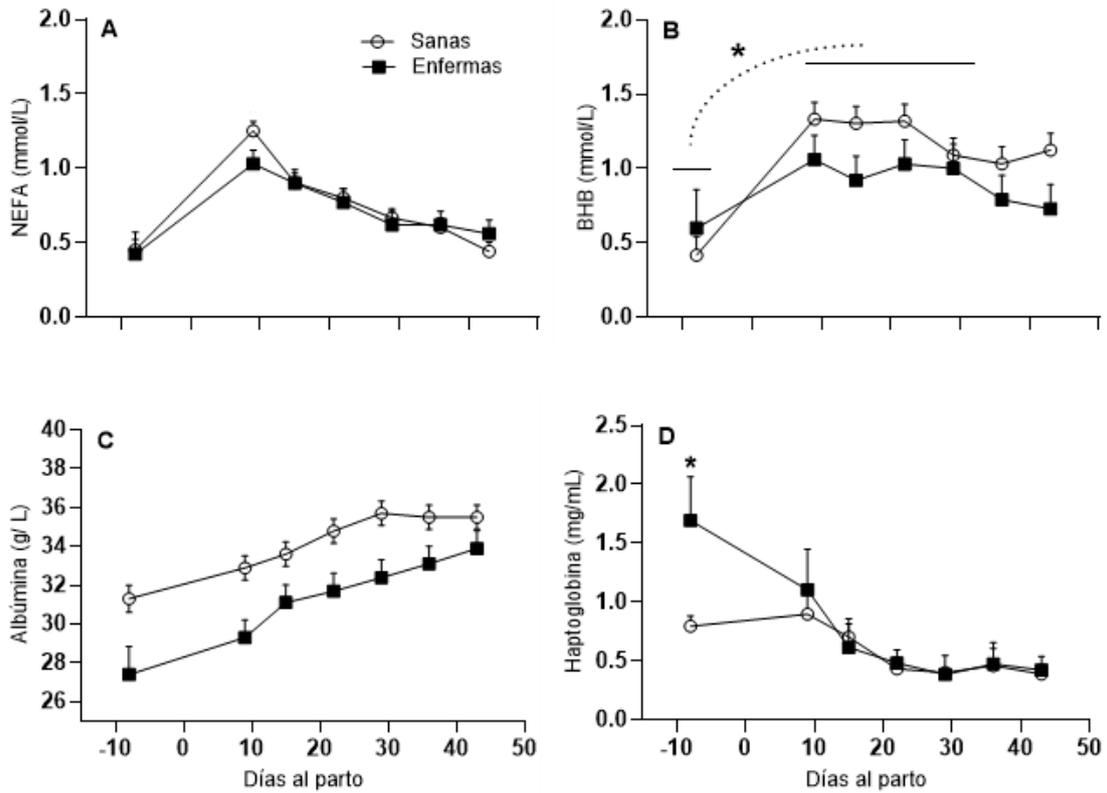


Figura 7. Concentración (promedio \pm E.E.M.) de metabolitos: **(A)** NEFA (mmol/L), **(B)** BHB (mmol/L), **(C)** Albúmina (g/L), y **(D)** Haptoglobina (mg/mL) en vacas sanas y enfermas desde 8 días antes del parto hasta 43 DPP. * Los valores difieren ($P < 0.05$) entre los días independiente de los grupos **(B)** y entre sanas y enfermas para los días posparto identificados **(D)**.

La concentración de calcio fue mayor en vacas sanas (2.12 ± 0.02 mmol/L) que en las vacas con infección uterina (2.04 ± 0.02 mmol/L; $P < 0.05$). No hubo efecto del tiempo ni interacción grupo * tiempo para las concentraciones de calcio (**Figura 8**). Las

concentraciones en suero de insulina (8.69 ± 1.06 ng/mL) e -73.9 ± 8.03 ng/mL) no fueron afectadas por el grupo, por el tiempo ni sus interacciones.

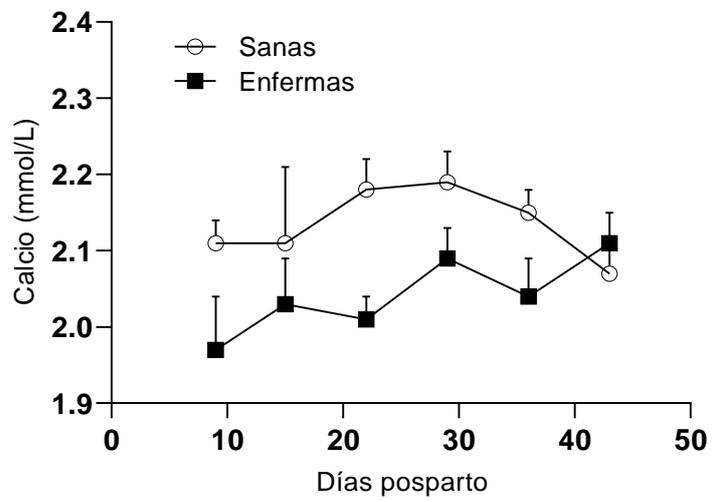


Figura 8. Concentración sérica (promedio \pm E.E.M.) de calcio en vacas sanas y con infección uterina desde 9 a 43 días posparto.

7. DISCUSIÓN

Este trabajo es el primero en investigar con un enfoque holístico el efecto de las enfermedades uterinas sin afección sistémica sobre la producción de leche, la involución uterina y morfología de las estructuras ováricas y relacionarlo con variables metabólicas e inmunológicas en vacas primíparas en condiciones pastoriles.

El presente estudio encontró que el 41.6 % de vacas primíparas presentaron metritis y endometritis, lo que es consistente con la incidencia a nivel internacional que puede variar entre 35 - 50% (Leblanc, 2012). Ruprechter et al. (2018) reportaron que el 39.2% de las primíparas paridas en otoño tienen metritis o endometritis hasta los 21 DPP, no encontrándose diferencia de la incidencia acorde a la paridad. En cambio, Giuliadori et al. (2013) en un predio comercial de Argentina muestran que las primíparas tienen una mayor incidencia (primíparas 48.9% y multíparas 35.2%) y que las primíparas tienen mayor probabilidad de descarga vaginal purulenta asociado con mayor problemas al parto (Giuliadori et al., 2017). Se ha discutido que la alta incidencia reportada en algunos casos podría estar explicada por incluir como endometritis vacas que tienen score 1 de descarga (Gobikrushanth et al., 2016), en nuestro estudio no se incluyen. Carvalho et al. (2019) reportan un 21% pero diagnosticando hasta 21 DPP y Ribeiro et al. (2013) 23.5 % haciendo tres revisiones hasta el día 28 posparto. En cambio nosotros seguimos evaluando la descarga vaginal y el 23 % de las vacas comenzaron la descarga vaginal anormal luego de 22 DPP. Incluso algunos trabajos reportan que se pueden detectar un porcentaje de vacas con endometritis clínica luego de los 33 DPP (Barlund et al., 2008; Dubuc et al., 2010a). Además, cuando no se hace una revisión semanal hay vacas que presentan infección pero autocuran antes de la próxima evaluación por lo que podría ocurrir un sub diagnóstico (Sheldon et al., 2006; Giuliadori et al., 2017). Por tanto creemos que nuestros resultados de incidencia reflejan la realidad ya que la metodología contempla esos aspectos.

En nuestro trabajo el grupo de vacas enfermas incluyó metritis grado 1 y endometritis clínica de acuerdo a la descarga vaginal (Sheldon et al., 2009), lo que fue consistente con el recuento de células inflamatorias mayor en el grupo enfermo. Este es el primer reporte de esta índole en nuestro país. A nivel internacional, Kasimanickam et al. (2004), describen una alta correlación entre la descarga vaginal purulenta y la alta citología. A su vez Mateus et al. (2002) y Williams et al. (2005) relacionaron el aspecto de la descarga vaginal purulenta y la alta carga bacteriana.

La tendencia a que la proporción de las vacas con infección uterina tuvieran previamente problemas al parto respecto de las sanas es consistente con estudios previos (Dubuc et al., 2010b). De igual forma este estudio no se diseñó para realizar estudios de este tipo, ya que el tamaño de la muestra es insuficiente. Los datos disponibles a nivel internacional muestran que las vacas con problemas al parto presentan desequilibrios en salud o metabolismo antes de la detección clínica (Curtis et al., 1985; Dubuc et al., 2010). Por lo tanto, el momento del diagnóstico a través de la descarga vaginal, además de definir la

enfermedad (metritis el día 9 y 15 posparto, o endometritis a los 22 o más DPP) puede estar relacionado a problemas al parto y retención de placenta.

El mayor diámetro de los cuernos uterinos en las enfermas respecto a las sanas que se detectó hasta los 15 DPP ya ha sido descrito (Mateus et al., 2002; Heppelmann et al., 2013b; Reshma et al., 2020). Esto está causado por aumento de contenido uterino, ya que a los loquios normales se suman más células epiteliales, células del sistema inmune y restos bacterianos, conformando la descarga vaginal purulenta (Williams et al., 2005; Földi et al., 2006). En menor proporción, el aumento del diámetro puede estar dado porque en las enfermas la pared uterina está más gruesa (Reshma et al., 2020). La importancia además del diagnóstico en sí mismo, radica en que se ha comprobado la relación entre un diámetro menor durante posparto temprano (Sheldon et al., 2003; Melendez et al., 2004) y previo a la inseminación (Baez et al., 2016) con mejor desempeño reproductivo. Nuestros resultados concuerdan con esos trabajos en cuanto a los cambios de tamaño de los cuernos uterinos a lo largo del tiempo, así como también las diferencias de diámetro entre los cuernos previamente grávidos y no grávidos (Okano & Tomizuka, 1987; Kamimura et al., 1993). Además, un estudio comparativo muestra que en primíparas la involución es más lenta y demora más días que en múltiparas (Zhang et al., 2010).

Para que la preñez pueda ser posible luego del parto, una condición necesaria es la regeneración endometrial, este proceso se completa alrededor de la sexta semana posparto (Bonnett et al., 1991b; Sheldon et al., 2008). Consiste en la regeneración de los tres estratos que lo componen: 1) de epitelio luminal; 2) el estrato compacto un tejido conjuntivo abundante en células; y 3) el estrato esponjoso en cuyo estroma hay menos cantidad de células, y se encuentran las glándulas endometriales secretoras de nutrientes para el embrión, vasos sanguíneos y linfáticos (Bonnett et al., 1991a). Además de estas funciones de secreción, el endometrio tiene un importante rol endócrino, y es la razón por la que en este estudio se incluyó la determinación del espesor del mismo. Nuestros resultados son similares a un estudio previo (López-Helguera et al., 2012) que realizaron tres revisiones de espesor endometrial posparto entre 15 y 35 DPP y no encontraron cambios de espesor a lo largo del tiempo. Sin embargo, ocurren cambios histológicos importantes en el endometrio durante el puerperio (Bonnett et al., 1991), pero no encontramos antecedentes sobre evaluaciones ecográficas del espesor endometrial antes de los 10 DPP que comparen vacas sanas y con infección uterina. Nuestros resultados muestran que el espesor endometrial fue menor en las enfermas (especialmente al día 9 DPP), esto puede estar relacionado con el proceso degenerativo del epitelio, con el contenido uterino y la atonía del miometrio en esos días (Földi et al., 2006). En otros trabajos se muestra que a partir del 15 DPP el espesor endometrial puede estar aumentado en vacas con metritis (Barlund et al., 2008; López-Helguera et al., 2012) por causa del edema e infiltración celular (Földi et al., 2006). Es posible que el hecho de no encontrar diferencias relevantes luego de los 9 DPP se asocia a que la inflamación no es tan grave para causar tal reacción (se incluyeron vacas sin afección sistémica). La medida de espesor endometrial puede ser una ayuda al diagnóstico ya que como complemento del

cytobrush puede aumentar la especificidad (Barlund et al., 2008). Se ha asociado negativamente el espesor endometrial aumentado a los 15 DPP sobre el reinicio de la actividad ovárica (López-Helguera et al., 2012), ya que altera la secreción de prostaglandinas (Lewis, 2003). Además el retraso en su regeneración puede producir pérdidas embrionarias tempranas por no proveer un ambiente uterino adecuado para la implantación del embrión (Walsh et al., 2011).

Previo a la regeneración endometrial, se ha descrito la necrosis isquémica que ocurre normalmente en las carúnculas durante el puerperio (Slama et al., 1991), y por tanto se requiere paulatinamente menos irrigación. Eso se ha corroborado con la rápida involución uterina en la primera semana posparto que es acompañada por una disminución del suministro de sangre a través de la arteria uterina, principalmente hasta el cuarto DPP en vacas sanas (Herzog & Bollwein, 2007). Un estudio en seis vacas primíparas Simmental mostró que esa disminución hasta el cuarto día posparto esta dada en gran parte por una disminución significativa del diámetro de la arteria uterina, pero luego del cuarto día no se detectan cambios de diámetro (Heppelmann et al., 2013a). Lamentablemente no poseemos información del diámetro de la arteria uterina a previo a los 9 DPP. Tampoco detectamos diferencias en el diámetro de la arteria uterina entre vacas sanas y vacas con metritis. Ese resultado concuerda con Reshma et al. (2020), que compararon seis vacas sanas y seis vacas con metritis a los 5, 10 y 15 DPP y no encontraron diferencias. Por otro lado, al momento del estro muestra que la arteria uterina media es de mayor diámetro en vacas que padecen metritis severa comparando con metritis leve o moderada (Sharma, et al., 2019). Esto parece mostrar que los cambios en el diámetro de la arteria uterina se hacen evidentes cuando las variaciones fisiológicas o patológicas son de gran magnitud como en el caso de la primer semana posparto y metritis severa respectivamente. En tanto que cambios sutiles en la necesidad de suministro de sangre podrían darse por otros cambios hemodinámicos y no por variaciones en el diámetro de de la arteria uterina (Krueger et al., 2009; Heppelmann, et al., 2013b).

El restablecimiento del eje hipotálamo- hipófisis- ovario- útero, y el reinicio de las primeras ondas foliculares posparto ha sido ampliamente descrito (Leslie, 1983; Savio et al., 1990). Como ha sido reportado (Fonseca et al., 1983 y Crowe, 2008), hemos encontrado un aumento del diámetro del folículo dominante durante los primeras semanas postparto, y consistente con la primera ovulación observada entorno a la tercera semana posparto. Incluso registramos algunas vacas que ovularon a los 15 DPP como también se ha reportado (Kawashima et al., 2007). Sin embargo, algunos trabajos muestran que en sistemas pastoriles, especialmente en primíparas, el intervalo parto- primera ovulación podría ser mayor que en vacas multíparas (Cavestany et al., 2009; Adrien et al., 2012) aun con condición corporal mayor a 3 (Meikle et al., 2004). La influencia del útero en la función ovárica, se puede ver alterada por la presencia de LPS en el útero, que aumenta la producción de prostaglandinas como parte de la reacción inflamatoria que se desencadena, aumenta la expresión génica de receptores de estradiol, y disminuyen los de progesterona en endometrio (Herath et al., 2006; Gabler et al., 2009), y es acompañado por aumento de progesterona y estradiol en sangre (Debertolis et al., 2016). A su vez se

puede ver alterada la influencia de los ovarios en la función uterina, hipotálamo e hipófisis mediante el estradiol y progesterona, ya que cuando ocurren infecciones uterinas, la presencia de LPS en el fluido folicular altera la secreción de estradiol y por lo tanto el crecimiento folicular y ovulación (Cheong et al., 2017; Gindri et al., 2019). En ese sentido se ha visto que aumenta el intervalo parto- primera ovulación en primíparas (Dourey et al., 2011). En el presente estudio no se asoció la infección uterina con probabilidad de ovulación, posiblemente por el reducido tamaño de muestra para ese análisis. Pero es un aspecto importante por el perjuicio en el desempeño reproductivo (de Boer et al., 2015; Giuliadori et al., 2017). Incluso en los casos que la fecundación ocurre, los embriones tienen menos calidad y menos chance de seguir su desarrollo (Ribeiro et al., 2016).

El menor peso vivo y menor producción de leche desde el inicio de la lactancia que ocurrió en las vacas enfermas, es probable que esté dado por menor consumo de alimento como se ha visto (Huzzey et al., 2007). En ese estudio se demostró que las vacas con metritis, ya durante el parto bajan el consumo de materia seca, cambian el comportamiento de consumo y tienden a beber menos agua y producen menos leche que las sanas (Huzzey et al., 2007; Giuliadori et al., 2013). Un trabajo con más de once mil primíparas muestra que las vacas con metritis producen 2.3 litros / día menos, incluso antes del diagnóstico (Rajala & Gröhn, 1998). En cuanto a la relación de producción de leche y concentración de NEFA y BHB, en primíparas se vio una correlación positiva entre ambas variables (Ospina et al., 2010b). Nuestros resultados de menor producción en vacas enfermas es consistente con las menores concentraciones de NEFA al final de la primera semana posparto y BHB durante las tres primeras semanas posparto, lo que sugiere que la producción no demandó tanta movilización de reservas como ha sido descrito previamente (Rupprechter et al., 2018). Esto difiere con trabajos que indican que los elevados niveles de NEFA y BHB son predictivos de enfermedades uterinas (Ospina et al., 2010a), otras enfermedades y menor producción de leche (Duffield et al., 2009). Esto podría estar explicado porque en primíparas el eje somatotrófico aún está enfocado en el crecimiento y no solamente en la producción, por lo que es capaz de disminuir el suministro de glucosa a la ubre, antes de recurrir a lipomovilización excesiva.

Se conoce la relación entre el estatus metabólico, las infecciones uterinas y la función del sistema inmune (Hammon et al., 2006; Pascottini & LeBlanc, 2020). Un estudio realizado a los 7 DPP (Paiano et al., 2019) muestra que vacas que padecen enfermedades metabólicas presentan un mayor espesor del endometrio. La vía por la que esto ocurre está íntimamente relacionado con el desbalance metabólico ya que se ha demostrado que elevados niveles de NEFA (Hammon et al., 2006) y BHB (Galvão et al., 2010) afecta el funcionamiento de neutrófilos. Eso podría enlentecer el *clearance* uterino por lo que la infección bacteriana persiste, llevando a mayor espesor endometrial. Paiano et al., (2019) no observaron diferencia en la incidencia de metritis entre los grupos de vacas que presentan perfiles metabólicos distintos, por lo que no es posible establecer una relación directa entre infección uterina y espesor endometrial. Sin embargo, nuestros datos de NEFA y BHB muestran que vacas que están en un BEN leve a moderado, y así mismo se pueden encontrar vacas sanas y vacas con metritis, teniendo entre ellas diferencias en el

espesor endometrial. Esto determina que, a pesar de presentar un perfil metabólico considerado estable, esta categoría de vacas podría ver su performance reproductiva afectada.

Uno de los hallazgos más interesantes de esta tesis son las menores concentraciones de albúmina y mayores de haptoglobina en el parto de las vacas enfermas, incluso esto se pudo observar dos semanas antes del diagnóstico de las patologías. La albúmina es una proteína plasmática producida en el hígado y considerada una proteína de fase aguda negativa ya que disminuye su secreción cuando el hígado tiene alta demanda de sintetizar otras proteínas (Souza et al., 2010). Los factores que se atribuyen a menor concentración de albúmina, puede ser por un deficiente aporte proteico en la dieta o por disminución de su síntesis a causa de una deficiencia hepática (Ruprecht et al., 2018). La relación de la baja concentración de albúmina parto con inflamación uterina parto ha sido reportada en diferentes estudios (Burke et al., 2010; Souza et al., 2010; Krause et al., 2014; Ruprecht et al., 2018); lo que corrobora que la albúmina puede ser considerado un marcador precoz para indicar enfermedades parto. Además, en el caso de la albúmina las concentraciones se mantuvieron bajas hasta 43 DPP. Algunos trabajos muestran que vacas con menor nivel de albúmina presentaron alta citología y mayor intervalo parto- ovulación (Burke et al., 2010; Krause et al., 2014). Por tanto, nuestros resultados sugieren que el evento de infección uterina registrado no fue tan severo para asociarse con lipomobilización excesiva, pero los resultados de albúmina podrían indicar que hay una repercusión en la funcionalidad hepática.

La haptoglobina es una proteína de fase aguda positiva, es un mediador inflamatorio y se produce en el hígado en respuesta a interleuquina 6 y $TNF\alpha$. Se ha relacionado su aumento en sangre durante la infección bacteriana y metritis (Sheldon et al., 2001; Huzzey et al., 2009; Dubuc et al., 2010). Nuestros resultados parto no mostraron esa diferencia en las vacas con infección uterina, tal vez porque fueron leves a moderadas. Pero, la concentración de haptoglobina parto fue mayor en vacas que posteriormente tuvieron infección uterina. Un estudio con 412 vacas en dos predios, muestra que la elevada haptoglobina parto no fue un factor de riesgo para enfermedades parto, y sugiere que no hay una relación directa, sino que un estado inflamatorio parto que se evidencia por elevada haptoglobina, predispone a problemas al parto como distocias y retención de placenta, y estos son los factores de riesgo para las infecciones puerperales (Huzzey et al., 2011).

Nuestros resultados de insulina e IGF- I no tuvieron aumento en los días estudiados, en contraposición a lo que ha sido publicado (Meikle et al., 2004; Meikle, et al., 2013). Estos valores podrían ser un reflejo de buen estatus nutricional desde inicio del parto (Adrien et al., 2012). Por tanto, el efecto que pueden tener infecciones leves o moderadas sobre las concentraciones de insulina e IGF- I, podrían estar amortiguadas por un alto estatus nutricional en primíparas.

Una limitante en este trabajo fue no tener datos de concentración de calcio cerca del parto ya que se ha relacionado la hipocalcemia subclínica alrededor del parto con mayor riesgo de padecer metritis (Martinez et al., 2012; Barragan et al., 2018). De igual forma, hemos encontrado menor concentración de calcio durante la lactancia temprana en las vacas enfermas de metritis o endometritis. La baja concentración de calcio posparto en las enfermas, junto con otros resultados de metabolitos y producción de leche podría sugerir que hubo una asociación entre hipocalcemia al parto e infecciones uterinas posteriores. A partir de la segunda semana, la calcemia fue similar a otros estudios en primíparas (Ruprechter et al., 2018).

8. CONCLUSIONES

- En vacas primíparas la presencia de endometritis clínica y metritis grado 1 (sin sintomatología sistémica), diagnosticada por la descarga vaginal, se asoció con aumento de células inflamatorias. También se vió afectada la involución uterina, evidenciada por mayor diámetro de cuernos uterinos durante las dos primeras semanas posparto, y menor espesor endometrial durante la primera semana posparto.
- Las vacas enfermas tuvieron menor peso vivo, menor producción de leche que estuvo asociada a una menor concentración de BHB y NEFA reflejando menor lipomovilización, hasta los 43 días posparto.
- La albúmina y haptoglobina se vieron afectados desde el parto en las vacas que enfermaron en el puerperio. La albúmina de vacas enfermas se mantuvo en niveles inferiores durante el posparto lo que sugiere que la funcionalidad hepática continúa alterada.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aagaard K, Antony K, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. (2014). The placenta harbors a unique microbiome. *Science Translational Medicine*, 6(237), 1–11.
- Adrien M, Mattiauda D, Artegoitia V, Carriquiry M, Motta G, Bentancur O, Meikle A. (2012). Nutritional regulation of body condition score at the initiation of the transition period in primiparous and multiparous dairy cows under grazing conditions : milk production , resumption of post-partum ovarian cyclicity and metabolic parameters. *Animal*, 6(2), 292–299.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783–801.
- Asselin E, Goff A, Bergeron H, Fortier M. (1996). Influence of Sex Steroids on the Production of Prostaglandins F2 α and E2 and Response to Oxytocin in Cultured Epithelial and Stromal Cells of the Bovine Endometrium1. *Biology of Reproduction*, 54(2), 371–379.
- Astessiano A, Carriquiry M, Mattiaudia D, Adrien M, Chilibroste P, Meikle A. (2017). Endometrial gene expression in primiparous dairy cows at the end of the voluntary waiting period is affected by nutrition : Total mixed ration vs increasing levels of herbage allowance. *Reproduction in Domestic Animals*, 1, 1–8.
- Baez G, Barletta R, Guenther J, Gaska J, Wiltbank M. (2016). Effect of uterine size on fertility of lactating dairy cows. *Theriogenology*, 85(8), 1357–1366.
- Barlund C, Carruthers T, Waldner C, Palmer C. (2008). A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology*, 69(6), 714–723.
- Barragan A, Piñeiro J, Schuenemann G, Rajala-Schultz P, Sanders D, Lakritz J, Bas S. (2018). Assessment of daily activity patterns and biomarkers of pain, inflammation, and stress in lactating dairy cows diagnosed with clinical metritis. *Journal of Dairy Science*, 1–11.
- Beam S, Butler W. (1998). Energy Balance, Metabolic Hormones, and Early Postpartum Follicular Development in Dairy Cows Fed Prilled Lipid. *Journal of Dairy Science*, 81(1), 121–131.
- Beam S, Butler W. (1997). Energy Balance and Ovarian Follicle Development Prior to the First Ovulation Postpartum in Dairy Cows Receiving Three Levels of Dietary Fat. *Biology of Reproduction*, 56(1), 133–142.
- Bollwein H, Meyer H, Maierl J, Weber F, Baumgartner U, Stolla R. (2000). Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow in cows during the estrous cycle. *Theriogenology*, 53(8), 1541–1552.
- Bollwein H, Heppelmann M. (2016). Ultrasonographic Doppler Use for Female Reproduction Management. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 32(1), 149–164.
- Bonnett B, Miller R, Etherington W, Martin S, Johnson W. (1991). Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. I. Technique, histological criteria and results. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Veterinaire*, 55(2), 155–161.

- Bonnett B, Miller R, Martin S, Etherington W, Buckrell B. (1991). Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. II. Correlations between histological criteria. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Vétérinaire*, 55(2), 162–167.
- Bradford B, Yuan K, Farney J, Mamedova L, Carpenter A. (2015). Invited review : Inflammation during the transition to lactation : New adventures with an old flame. *Journal of Dairy Science*, 98(10), 6631–6650.
- Burke C, Meier S, Mcdougall S, Compton C, Mitchell M, Roche J. (2010). Relationships between endometritis and metabolic state during the transition period in pasture-grazed dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93(11), 5363–5373.
- Buso R, Campos C, Santos T, Saut J, Santos R. (2018). *Retenção de placenta e endometrite subclínica : prevalência e relação com o desempenho reprodutivo de vacas leiteiras mestiças 1*. 38(1), 1–5.
- Butler W. (2003). Energy balance relationships with follicular development ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livestock Production Science*, 83(2–3), 211–218.
- Carneiro L, Cronin J, Sheldon I. (2016). Mechanisms linking bacterial infections of the bovine endometrium to disease and infertility. *Reproductive Biology*, 16(1), 1–7.
- Carvalho M, Peñagaricano F, Santos J, DeVries T, McBride B, Ribeiro E. (2019). Long-term effects of postpartum clinical disease on milk production, reproduction, and culling of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 102(12), 11701–11717.
- Cavestany D, Blanc J, Kulcsar M, Uriarte G, Chilbroste P, Meikle A, Febel H, Ferraris A, Krall E. (2005). Studies of the transition cow under a pasture-based milk production system: Metabolic profiles. *Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine*, 52(1), 1–7.
- Cavestany D, Viñoles C, Crowe M, 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(1–3), 1–13.
- Chapinal N, Carson M, Duffield T, Capel M, Godden S, Overton M, Santos J, LeBlanc S. (2011). The association of serum metabolites with clinical disease during the transition period. *Journal of Dairy Science*, 94(10), 4897–4903.
- Chapinal N, LeBlanc S, Carson M, Leslie K, Godden S, Capel M, Santos J, OvertonMW, DuffieldTF. (2012). Herd-level association of serum metabolites in the transition period with disease, milk production, and early lactation reproductive performance. *Journal of Dairy Science*, 95(10), 5676–5682.
- Cheong S, Filho O, SchneiderA, ButlerW, GilbertR. (2017). Uterine and systemic inflammation influences ovarian follicular function in postpartum dairy cows. *Plos One*, 12(5), 1–16.
- Cheong S, Nydam D, Galvão K, Crosier B, Gilbert R. (2011). Cow-level and herd-level risk factors for subclinical endometritis in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 94(2), 762–770.
- Crowe M, Diskin M, Williams E. (2014). Parturition to resumption of ovarian cyclicity: Comparative aspects of beef and dairy cows. *Animal*, 8(SUPPL. 1), 40–53.
- Crowe M. (2008). Resumption of ovarian cyclicity in post-partum beef and dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(SUPPL. 5), 20–28.

- Curtis C, Erb H, Sniffen C, Smith D, Kronfeld D. (1985). Path Analysis of Dry Period Nutrition, Postpartum Metabolic and Reproductive Disorders, and Mastitis in Holstein Cows. *Journal of Dairy Science*, 68, 2347–2360.
- Daros R, Hötzel M, Bran J, LeBlanc S, von Keyserlingk M. (2017). Prevalence and risk factors for transition period diseases in grazing dairy cows in Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, 145(1), 16–22.
- de Boer M, Buddle B, Heuer C, Hussein H, Zheng T, LeBlanc S, McDougall S. (2015). Associations between intrauterine bacterial infection, reproductive tract inflammation, and reproductive performance in pasture-based dairy cows. *Theriogenology*, 83(9), 1514–1524.
- De Rensis F, Lopez-Gatius F, García-Ispuerto I, Morini G, Scaramuzzi R. (2017). Causes of declining fertility in dairy cows during the warm season. *Theriogenology*, 91, 145–153.
- de Tarso S, Ishak G, Gastal G, Bashir S, Gastal M, Gastal E. (2016). Novel prospects for evaluation of follicle wall blood flow using color-Doppler ultrasonography. *Animal Reproduction*, 13(4), 762–771.
- Debertolis L, Mari G, Merlo B, Merbach S, Schoon H, Iacono E. (2016). Effects of induced endometritis on uterine blood flow in cows as evaluated by transrectal Doppler sonography. *Journal of Veterinary Science*, 17(2), 189–197.
- Denis-Robichaud J, Dubuc J. (2015). Determination of optimal diagnostic criteria for purulent vaginal discharge and cytological endometritis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 98, 1–8.
- DIEA- MGAP. (2019). Anuario estadístico 2019. *Anuario Estadístico Agropecuario*. <http://www.mgap.gub.uy/unidad-organizativa/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-diea>.
- Divers T, Peek S. (2008). *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle*. Ed. Elsevier 2^a ed NY.
- Dourey A, Colazo M, Barajas P, Ambrose D. (2011). Relationships between endometrial cytology and interval to first ovulation, and pregnancy in postpartum dairy cows in a single herd. *Research in Veterinary Science*, 91(3), 149–153.
- Drillich M, Beetz O, Pfützner A, Sabin M, Sabin H, Kutzer P, Nattermann H, Heuwieser W. (2001). Evaluation of a systemic antibiotic treatment of toxic puerperal metritis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 84(9), 2010–2017.
- Dubuc J, Duffield T, Leslie K, Walton J, LeBlanc S. (2010a). Definitions and diagnosis of postpartum endometritis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93(11), 5225–5233.
- Dubuc J, Duffield T, Leslie K, Walton J, LeBlanc S. (2010b). Risk factors for postpartum uterine diseases in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93(12), 5764–5771.
- Duffield T, Lissemore K, McBride B, Leslie K. (2009). Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *Journal of Dairy Science*, 92(2), 571–580.
- Fariña S. (2017). Sistema de pastoreo La Estanzuela. *Boletín de divulgación* 115, 3-12.
- Fariña S, Chilibróste P. (2019). Opportunities and challenges for the growth of milk production from pasture: The case of farm systems in Uruguay. *Agricultural Systems*, 176, 1-9.

- Földi J, Kulcsár M, Pécsi A, Huyghe B, de Sa C, Lohuis J, Cox P, Huszenicza G. (2006). Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle. *Animal Reproduction Science*, 96(3–4), 265–281.
- Fonseca F, Britt J, McDaniel B, Wilk J, Rakes A. (1983). Reproductive Traits of Holsteins and Jerseys. Effects of Age, Milk Yield, and Clinical Abnormalities on Involution of Cervix and Uterus, Ovulation, Estrous Cycles, Detection of Estrus, Conception Rate, and Days Open. *Journal of Dairy Science*, 66(5), 1128–1147.
- Fourichon C, Seegers H, Malher X. (2000). Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis. *Natural Language Engineering*, 11(1), 67–86.
- Gabler C, Drillich M, Fischer C, Holder C, Heuwieser W, Einspanier R. (2009). Endometrial expression of selected transcripts involved in prostaglandin synthesis in cows with endometritis. *Theriogenology*, 71(6), 993–1004.
- Galvão K, Flaminio M, Brittin S, Sper R, Fraga M, Caixeta L, Ricci A, Guard C, Butler W, Gilbert R. (2010). Association between uterine disease and indicators of neutrophil and systemic energy status in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 93(7), 2926–2937.
- Gilbert R, Shin S, Guard C, Erb H, Frajblat M. (2005). Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology*, 64(9), 1879–1888.
- Gindri P, de Ávila N, Mion B, Garziera B, Catarelli L, Alveiro J, Diniz A, Pradié J, Machado L, Nunes, Schneider A. (2019). Intrafollicular lipopolysaccharide injection delays ovulation in cows. *Animal Reproduction Science*, 211, 1–8.
- Giuliodori M, Magnasco M, Magnasco R, Lacau-Mengido I, de la Sota R. (2017). Purulent vaginal discharge in grazing dairy cows: Risk factors, reproductive performance, and prostaglandin F 2 α treatment. *Journal of Dairy Science*, 100(5), 3805–3815.
- Giuliodori M, Magnasco R, Becu-Villalobos D, Lacau-Mengido I, Risco C, de la Sota R. (2013). Metritis in dairy cows: Risk factors and reproductive performance. *Journal of Dairy Science*, 96(6), 3621–3631.
- Gobikrushanth M, Salehi R, Ambrose D, Colazo M. (2016). Categorization of endometritis and its association with ovarian follicular growth and ovulation, reproductive performance, dry matter intake, and milk yield in dairy cattle. *Theriogenology*, 86(7), 1842–1849.
- Griffin J, Hartigan P, Nunn W. (1974). Non-Specific uterine infection and bovine fertility. Infection patterns and endometritis during the first seven weeks postpartum. *Theriogenology*, 1(3), 11–30.
- Gröhn Y, Erb H, McCulloch C, Saloniemi H. (1990). Epidemiology of reproductive disorders in dairy cattle: associations among host characteristics, disease and production. *Preventive Veterinary Medicine*, 8(1), 25–39.
- Grohn Y, Rajala-Schultz A. (2000). Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 60–61, 605–614.
- Hammon D, Evjen I, Dhiman T, Goff J, Walters J. (2006). Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 113(1–2), 21–29.
- Heppelmann M, Krüger L, Leidl S, Bollwein H. (2013). Transrectal Doppler

- sonography of uterine blood flow during the first two weeks after parturition in Simmenthal heifers. *Journal of Veterinary Science*, 14(3), 323–327.
- Heppelmann M, Weinert M, Brömmling A, Piechotta M, Hoedemaker M, Bollwein H. (2013). The effect of puerperal uterine disease on uterine involution in cows assessed by Doppler sonography of the uterine arteries. *Animal Reproduction Science*, 143(1–4), 1–7.
- Herath S, Fischer D, Werling D, Williams E, Lilly S, Dobson H, Bryant C, Sheldon I. (2006). Expression and function of toll-like receptor 4 in the endometrial cells of the uterus. *Endocrinology*, 147(1), 562–570.
- Herzog K, Bollwein H. (2007). Application of Doppler Ultrasonography in Cattle Reproduction Evaluation of Colour Doppler Sonographic. *Reproduction in Domestic Animals*, 42(2), 51–58.
- Hoeben D, Heyneman R, Burvenich C. (1997). Elevated levels of β -hydroxybutyric acid in periparturient cows and in vitro effect on respiratory burst activity of bovine neutrophils. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 58(2), 165–170.
- Huzzey J, Duffield T, LeBlanc S, Veira D, Weary D, von Keyserlingk M. (2009). Short communication: Haptoglobin as an early indicator of metritis. *Journal of Dairy Science*, 92(2), 621–625.
- Huzzey J, Nydam D, Grant R, Overton T. (2011). Associations of prepartum plasma cortisol, haptoglobin, fecal cortisol metabolites, and nonesterified fatty acids with postpartum health status in Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 94(12), 5878–5889.
- Huzzey J, Veira D, Weary D, von Keyserlingk M. (2007). Prepartum Behavior and Dry Matter Intake Identify Dairy Cows at Risk for Metritis. *Journal of Dairy Science*, 90(7), 3220–3233.
- Ishikawa Y, Nakada K, Hagiwara K, Kirisawa R, Iwai H, Moriyoshi M, Sawamukai Y. (2004). Changes in interleukin-6 concentration in peripheral blood of pre- and post-partum dairy cattle and its relationship to postpartum reproductive diseases. *Journal of Veterinary Medical Science*, 66(11), 1403–1408.
- Ito I, Hayashi T, Yamada K, Kuzuya M, Naito M, Iguchi A. (1995). Physiological concentration of estradiol inhibits polymorphonuclear leukocyte chemotaxis via a receptor mediated system. *Life Sciences*, 56(25), 2247–2253.
- Kamimura S, Ohgi T, Takahashi M, Tsukamoto T. (1993). Postpartum resumption of ovarian activity and uterine involution monitored by ultrasonography in holstein cow. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 43, 643–647.
- Karstrup C, Klitgaard K, Jensen T, Agerholm J, Pedersen H. (2017). Presence of bacteria in the endometrium and placentomes of pregnant cows. *Theriogenology*, 99, 41–47.
- Kasimanickam R, Duffield T, Foster R, Gartley C, Leslie K, Walton J, Johnson W. (2004). Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, 62(1), 9–23.
- Kawashima C, Fukihara S, Maeda M, Kaneko E, Amaya C, Matsui M, Shimizu T, Matsunaga N, Kida K, Miyake Y, Schams D, Miyamoto A. (2007). Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave post-partum in high-producing dairy cows. *Reproduction*, 133(1), 155–163.

- Kim I, Kang H. (2003). Risk Factors for Postpartum Endometritis and the Effect of Endometritis on Reproductive Performance in Dairy Cows in Korea. *Journal of Reproduction and Development*, 49(6), 485–491.
- Kimura K, Reinhardt T, Goff J. (2006). Parturition and Hypocalcemia Blunts Calcium Signals in Immune Cells of Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, 89(7), 2588–2595.
- Kooijman R, Coppens A, Hooghe-Peters E. (2003). IGF-I stimulates IL-8 production in the promyelocytic cell line HL-60 through activation of extracellular signal-regulated protein kinase. *Cellular Signalling*, 15(12), 1091–1098.
- Krause R, Pfeife rL, Montagner P, Weschenfelder M, Schwegler E, Lima M, Xavier E, Brauner C, Schmitt E, Del F, Martins C, Corrêa M, Schneider A. (2014). Associations between resumption of postpartum ovarian activity , uterine health and concentrations of metabolites and acute phase proteins during the transition period in Holstein cows. *Animal Reproduction Science*, 145(1), 8–14.
- Krueger L, Koerte J, Tsousis G, Herzog K, Flachowsky G, Bollwein H. (2009). Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow during the first 12 weeks after parturition in healthy dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 114, 23–31.
- Kulcsar M, Katai L, Balogh O, Pécsi A, Deleuvaud C, Foldi J, Faigl V, Chilliard Y, HuszeniczaG. (2005). Metabolic and endocrine changes, inflammatory proteins and ovarian activity in dairy cow with acute puerperal metritis. Abstract. *Reproduction in Domestic Animals*, 40, 407-408.
- Lamote I, Meyer E, De Ketelaere A, Duchateau L, Burvenich C. (2006). Expression of the estrogen receptor in blood neutrophils of dairy cows during the periparturient period. *Theriogenology*, 65(6), 1082–1098.
- Lamote I, Meyer E, Duchateau L, Burvenich C. (2004). Influence of 17 β -estradiol, progesterone, and dexamethasone on diapedesis and viability of bovine blood polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Dairy Science*, 87(10), 3340–3349.
- LeBlanc S, Duffield T, Leslie K, Bateman K, Keefe G, Walton J, Johnson W. (2002). Defining and Diagnosing Postpartum Clinical Endometritis and its Impact on Reproductive Performance in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 85(9), 2223–2236.
- LeBlanc S, Leslie K, Duffield T. (2005). Metabolic Predictors of Displaced Abomasum in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, 88(1), 159–170.
- Leblanc S. (2012). Interactions of Metabolism, Inflammation, and Reproductive Tract Health in the Postpartum Period in Dairy Cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(5), 18–30.
- LeBlanc S. (2008). Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: A review. *Veterinary Journal*, 176(1), 102–114.
- LeBlanc S. (2010). Monitoring Metabolic Health of Dairy Cattle in the Transition Period. *Journal of Reproduction and Development*, 56(1), 29–35.
- Lee S, Jeong J, Choi I, Kang H, Jung Y, Park S, Kim I. (2018). Cytological endometritis in dairy cows: diagnostic threshold, risk factors, and impact on reproductive performance. *Journal of Veterinariy Science*, 19(2), 301–308.
- Leslie K. (1983). The events of normal and abnormal postpartum reproductive endocrinology and uterine involution in dairy cows: a review. *The Canadian*

- Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne*, 24(3), 67–71.
- Lewis G. (2003). Steroidal regulation of uterine resistance to bacterial infection in livestock. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1, 1–8.
- Liang D, Arnold L, Stowe C, Harmon R, Bewley J. (2017). Estimating US dairy clinical disease costs with a stochastic simulation model. *Journal of Dairy Science*, 100(2), 1472–1486.
- Llewellyn S, Fitzpatrick R, Kenny D, Patton J, Wathes D. (2008). Endometrial expression of the insulin-like growth factor system during uterine involution in the postpartum dairy cow. *Domestic Animal Endocrinology*, 34(4), 391–402.
- López-Helguera I, López-Gatius F, Garcia-Ispierto I. (2012). The influence of genital tract status in postpartum period on the subsequent reproductive performance in high producing dairy cows. *Theriogenology*, 77(7), 1334–1342.
- Lucy M. (2001). Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? *Journal of Dairy Science*, 84(6), 1277–1293.
- Lucy M. (2003). Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows. *Reproduction Supplement*, 61, 415–427.
- Madsen S, Weber P, Burton J. (2002). Altered expression of cellular genes in neutrophils of periparturient dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 86(3–4), 159–175.
- Marini P, Di Masso R. (2018). Historical evolution of productive indicators in dairy cows in grazing systems. *Granja*, 28(2), 103–115.
- Martinez N, Risco C, Lima F, Bisinotto R, Greco L, Ribeiro E, Maunsell F, Galvão K, Santos J. (2012). Evaluation of periparturient calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. *Journal of Dairy Science*, 95(12), 7158–7172.
- Mateus L, Lopes Da Costa L, Bernard F, Silva J. (2002). Influence of puerperal uterine infection on uterine involution and postpartum ovarian activity in dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 37(1), 31–35.
- McDougall S, Hussein H, Aberdein D, Buckle K, Roche J, Burke C, Mitchell M, Meier S. (2011). Relationships between cytology, bacteriology and vaginal discharge scores and reproductive performance in dairy cattle. *Theriogenology*, 76(2), 229–240.
- Meikle A, Cavestany D, Carriquiry M, Adrien M, Artegoitia V, Pereira I, Rupprechter G, Pessina P, Rama G, Fernández A, Breijo M, Laborde D, Pritsch O, Ramos J, de Torres E, Nicolini P, Mendoz aA, Dutour J, Fajardo M, Chilibroste 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.
- Meikle A, Kulcsar M, Chilliard Y, Febel H, Delavaud C, Cavestany D, Chilibroste P. (2004). Effects of parity and body condition at parturition on endocrine and reproductive parameters of the cow. *Reproduction*, 127(6), 727–737.
- Meikle A, Lourdes M, Antonio D, Chilibroste P. (2013). Effect of sward condition on metabolic endocrinology during the early postpartum period in primiparous grazing dairy cows and its association with productive and reproductive performance. *Animal Feed Science and Technology*, 186(3–4), 139–147.
- Melendez P, McHale J, Bartolome J, Archbald L, Donovan G. (2004). Uterine

- involution and fertility of Holstein cows subsequent to early postpartum PGF2 α treatment for acute puerperal metritis. *Journal of Dairy Science*, 87(10), 3238–3246.
- Mendoza A, La Manna A, Crespi D, Crowe M, Cavestany D. (2008). Whole sunflower seeds as a source of polyunsaturated fatty acids for grazing dairy cows: Effects on metabolic profiles and resumption of postpartum ovarian cyclicity. *Livestock Science*, 119(1–3), 183–193.
- Nicolini P, Carriquiry M, Meikle A. (2013). A polymorphism in the insulin-like growth factor 1 gene is associated with postpartum resumption of ovarian cyclicity in Holstein-Friesian cows under grazing conditions. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55, 11.
- NRC. (2001). ‘Nutrient requirements of dairy cattle.’ 7th rev. edn. (National Academy Press: Washington, DC).
- Okano A, Tomizuka T. (1987). Ultrasonic observation of postpartum uterine involution in the cow. *Theriogenology*, 27(2), 369–376.
- Opsomer G, Gröhn Y, Hertl J, Coryn M, Deluyker H, Kruift A. (2000). Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cow in Belgium: a field study. *Theriogenology*, 53, 841–857.
- Ospina P, Nydam D, Stokol T, Overton T. (2010a). Evaluation of nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. *Journal of Dairy Science*, 93(2), 546–554.
- Ospina P, Nydam D, Stokol T, Overton T. (2010b). Associations of elevated nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the northeastern United States. *Journal of Dairy Science*, 93(4), 1596–1603.
- Paiano R, Birgel D, Junior E. (2019). Uterine involution and reproductive performance in dairy cows with metabolic diseases. *Animals*, 9(3), 1–10.
- Pascottini O, LeBlanc S. (2020). Modulation of immune function in the bovine uterus peripartum. *Theriogenology*, 150, 193–200.
- Rajala P, Gröhn Y. (1998). Effects of Dystocia, Retained Placenta, and Metritis on Milk Yield in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 81(12), 3172–3181.
- Reinhardt T, Lippolis J, McCluskey B, Goff J, Horst R. (2011). Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. *Veterinary Journal*, 188(1), 122–124.
- Reshma A, Sathiamoorthy T, Sridevi P, Tirumurugaan K. (2020). Ultrasonography evaluation of uterine involution in normal and metritis affected postpartum cows. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 8(3), 1823–1826.
- Ribeiro E, Gomes G, Greco L, Cerri R, Vieira-Neto A, Monteiro P, Lima F, Bisinotto R, Thatcher W, Santos J. (2016). Carryover effect of postpartum inflammatory diseases on developmental biology and fertility in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 99(3), 2201–2220.
- Ribeiro E, Lima F, Greco L, Bisinotto R, Monteiro A, Favoreto M, Ayres H, Marsola R, Martinez N, Thatcher W, Santos J. (2013). Prevalence of periparturient diseases and effects on fertility of seasonally calving grazing dairy cows supplemented with concentrates. *Journal of Dairy Science*, 96(9), 5682–5697.

- Risco C, Drost M, Thatcher W, Savio J, Thatcher M. (1994). Effects of calving-related disorders on prostaglandin, calcium, ovarian activity and uterine involution in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, 42(1), 183–203.
- Roche J, MacKey D, Diskin M. (2000). Reproductive management of postpartum cows. *Animal Reproduction Science*, 60–61, 703–712.
- Rupprechter G, Adrien M, Larriestra A, Meotti O, Batista C, Meikle A, Noro M. (2018). Predictors of peri-partum diseases and their association with parity in dairy cows. *Research in Veterinary Science*, 118(1), 191–198.
- Santos T, Bicalho R. (2012). Diversity and Succession of Bacterial Communities in the Uterine Fluid of Postpartum Metritic, Endometritic and Healthy Dairy Cows. *PLoS ONE*, 7(12), 1-10.
- Savio J, Boland M, Hynes N, Roche J. (1990). Resumption of follicular activity in the early post-partum period of dairy cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, 88(2), 569–579.
- Scalia D, Lacetera N, Bernabucci U, Demeyere K, Duchateau L, Burvenich C. (2006). In Vitro Effects of Nonesterified Fatty Acids on Bovine Neutrophils Oxidative Burst and Viability. *Journal of Dairy Science*, 89(1), 147–154.
- Sharma A, Singh M, Abrol A, Soni T. (2019). Doppler sonography of uterine blood flow at mid-oestrus during different degree of clinical endometritis in dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(9), 1274–1278.
- Sheldon I, Noakes D, Dobson H. (2000). The influence of ovarian activity and uterine involution determined by ultrasonography on subsequent reproductive performance of dairy cows. *Journal of Visual Languages & Computing*, 11(3), 287–301.
- Sheldon I, Noakes D, Rycroft A, Dobson H. (2001). Acute phase protein responses to uterine bacterial contamination in cattle after calving. *Veterinary Record*, 148(6), 172–175.
- Sheldon I, Noakes D, Rycroft A, Pfeiffer D, Dobson H. (2002). Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction*, 123(6), 837–845.
- Sheldon I, Cronin J, Goetze L, Donofrio G, Schuberth H. (2009). Defining Postpartum Uterine Disease and the Mechanisms of Infection and Immunity in the Female Reproductive Tract in Cattle1. *Biology of Reproduction*, 81(6), 1025–1032.
- Sheldon I, Lewis G, LeBlanc S, Gilbert R. (2006). Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology*, 65(8), 1516–1530.
- Sheldon I, Noakes D, Rycroft A, Dobson H. (2003). The effect of intrauterine administration of estradiol on postpartum uterine involution in cattle. *Theriogenology*, 59(5–6), 1357–1371.
- Sheldon I, Williams E, Miller A, Nash D, Herath S. (2008). Uterine diseases in cattle after parturition. *Veterinary Journal*, 176(1), 115–121.
- Sheldon I, Cronin J, Bromfield J. (2019). Tolerance and Innate Immunity Shape the Development of Postpartum Uterine Disease and the Impact of Endometritis in Dairy Cattle. *Ann. Rev. Anim. Biosci.*, 1–24.
- Sheldon I, Molinari P, Ormsby T, Bromfield J. (2020). Preventing postpartum uterine disease in dairy cattle depends on avoiding, tolerating and resisting pathogenic bacteria. *Theriogenology*.

- Sheldon I, Noakes D, Rycroft A, Dobson H. (2004). Effect of intrauterine administration of oestradiol on postpartum uterine bacterial infection in cattle. *Animal Reproduction Science*, 81(1–2), 13–23.
- Singh J, Murray R, Mishelia G, Woldehiwet Z. (2008). The immune status of the bovine uterus during the peripartum period. *The Veterinary Journal*, 175, 301–309.
- Slama H, Goff A, Vaillancourt D. (1994). Effect of bacterial wall and lipopolysaccharide on arachidonic acid metabolism by caruncular and allantochorionic tissues from cow that calved normally and those that retained fetal membranes. *Theriogenology*, 41, 923–942.
- Slama H, Vaillancourt D, Goff A. (1991). Pathophysiology of the puerperal period: relationship between prostaglandin E₂ (PGE₂) and uterine involution in the cow. *Theriogenology*, 36(6), 1071–1090.
- Sordillo L, Aitken S. (2009). Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128(1–3), 104–109.
- Souza R, Yasuoka M, Leão D, Birgel-Junior E. (2010). Inter-Relações Entre a Função Hepática, Lipidograma E Os Distúrbios Inflamatórios Do Endométrio (Endometrites Puerperais Agudas, Retenção Dos Anexos Fetais E Catarros Genitais) De Fêmeas Bovinas Da Raça Holandesa. *Ciência Animal Brasileira*, 11(4), 880–887.
- Steel J, Malatos S, Kennea N, Edwards A, Miles L, Duggan P, Reynolds P, Feldman R, Sullivan M. (2005). Bacteria and inflammatory cells in fetal membranes do not always cause preterm labor. *Pediatric Research*, 57(3), 404–411.
- Ster C, Loiselle M, Lacasse P. (2012). Effect of postcalving serum nonesterified fatty acids concentration on the functionality of bovine immune cells. *Journal of Dairy Science*, 95(2), 708–717.
- Strüve K, Herzog K, Magata F, Piechotta M, Shirasuna K, Miyamoto A. (2013). The effect of metritis on luteal function in dairy cows. *Veterinary Research*, 244(9), 1–9.
- Suriyasathaporn W, Heuer C, Noordhuizen-Stassen E, Schukken Y. (2000). Hyperketonemia and the impairment of udder defense: A review. *Veterinary Research*, 31(4), 397–412.
- Valdmann M, Kurykin J, Kaart T, Mällo G, Waldmann A. (2018). Relationships between plasma insulin-like growth factor-1 and insulin concentrations in multiparous dairy cows with cytological endometritis. *Veterinary Record*, 1–7.
- Vangroenweghe F, Lamote I, Burvenich C. (2005). Physiology of the periparturient period and its relation to severity of clinical mastitis. *Domestic Animal Endocrinology*, 29(2), 283–293.
- Walsh S, Williams E, Evans A. (2011). A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 123(3–4), 127–138.
- Whiteford L, Sheldon I. (2005). Association between clinical hypocalcaemia and postpartum endometritis. *Veterinary Record*, 157(7), 202–204.
- Williams E, Fischer D, Noakes D, England G, Rycroft A, Dobson H, Sheldon I. (2007). The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology*, 68(4), 549–559.

- Williams E, Fischer D, Pfeiffer D, Noakes D, Dobson H, Sheldon I. (2005). Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology*, 63, 102–117.
- Zerbe H, Schneider N, Leibold W, Wensing T, Kruip T, Schuberth H. (2000). Altered Functional and immunophenotypical properties of neutrophilic granulocytes in postpartum cows associated With Fatty Liver. *Theriogenology*, 54(00), 771–786.
- Zerbe H, Schuberth H, Engelke F, Frank J, Klug E, Leibold W. (2003). Development and comparison of in vivo and in vitro models for endometritis in cows and mares. *Theriogenology*, 60(2), 209–223.
- Zhang J, Deng L, Zhang H, Hua G, Han L, Zhu Y, Meng X, Yang L. (2010). Effects of parity on uterine involution and resumption of ovarian activities in postpartum Chinese Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93(5), 1979–1986.

10. ANEXO I

VACA N°: _____ **Fecha Parto Real:** _____

FECHA PREVISTA PARTO:		
PARTO N°:		
CONDICIÓN CORPORAL:		
PRIMEROS SÍNTOMAS DE PARTO	DÍA:	HORA:
1ª cría COMIENZO EXPULSIÓN (aparecen las manos)	DÍA:	HORA:
1ª cría PARTO: (expulsión total)	DÍA:	HORA:
2ª cría - COMIENZO EXPULSIÓN (aparecen las manos)	DÍA:	HORA:
2ª cría - PARTO: (expulsión total)	DÍA:	HORA:
DURACIÓN TOTAL del PARTO: (e/ aparición de las manos y que salió)	HORAS:	
EXPULSIÓN DE LA PLACENTA	DÍA:	HORA: RETIENE:
OBSERVACIONES:		

NECESITÓ AYUDA AL PARTO: SI: NO:	LA VACA ESTA NORMAL:
AYUDA LEVE ¹:	HIPOCALCEMIA:
AYUDA IMPORTANTE ²:	PROBLEMAS TRAUMÁTICOS:
VENÍA MAL POSICIONADO:	CAÍDA:
OTRA SITUACION ³:	OTRA SITUACIÓN ⁴:
OBSERVACIONES:	OBSERVACIONES:

¹ una persona tracciona las manos y sale. ² necesita tracción de 2 personas o fórceps y más tiempo

³ Mellizos, deforme, cesárea, etc. ⁴ Agotamiento, muerte, hemorragia, mastitis, edema ubre, etc.

CRÍA 1		CRÍA 2 (para caso de mellizos)	
SEXO: MACHO:	HEMBRA:	SEXO: MACHO:	HEMBRA:
ESTADO: VIVO:	MUERTO:	ESTADO: VIVO:	MUERTO:
SE PARÓ: SI:	NO:	SE PARÓ: SI:	NO:
TOMÓ CALOSTORO: SÍ:	NO:	TOMÓ CALOSTORO: SÍ:	NO:
N° CARAVANA ASIGNADO:		N° CARAVANA ASIGNADO:	
PESO AL NACER:		PESO AL NACER:	
OBSERVACIONES:		OBSERVACIONES:	
LA VACA SE ASIGNA A GRUPO: CONTROL O PROBLEMA			

