

El manejo nutricional durante los primeros 21 días postparto afecta la metabolómica endometrial al final del periodo de espera voluntario de vacas lecheras

G.R. Mendina¹, M.L. Adrien¹, A. López, G. Moyna², C. Rivoir, P. Chilbroste³, A. Meikle⁴

1- Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Ruta 3, km 363, Paysandú, 60000, Uruguay;

2- Departamento de Química del Litoral, CENUR-LN, Universidad de la República, Ruta 3 Km 363, Paysandú 60000, Uruguay;

3- Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Ruta 3, km 363, Paysandú, 60000, Uruguay;

4- Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Ruta 8 km 18, Montevideo, 13000, Uruguay;

*Autor de correspondencia: g.rmendina@gmail.com

RESUMEN

El objetivo fue evaluar un encierro estratégico con DTM *ad libitum* (T21) durante los primeros 21 días postparto (dpp) en comparación a un grupo que accedía al pastoreo y recibía DTM luego del parto (T0), sobre el ambiente uterino a los 60 dpp. A los 22 dpp T21 fue manejado junto a T0 hasta los 60 dpp. Se tomó una biopsia endometrial a los 60 dpp (día 7 del ciclo estral aproximadamente), luego de una sincronización de estro. Utilizamos un abordaje de metabolómica por ¹H RMN no dirigido para comprender el microambiente uterino. Los resultados sugieren un esfuerzo metabólico luego del cambio de manejo en T21 para sostener la alta producción de leche, indicado por varios metabolitos asociados a la movilización de reservas corporales y probable destino a neoglucogénesis. Los datos sugieren que el manejo nutricional podría tener un efecto a mediano plazo sobre la funcionalidad uterina.

SUMMARY

The objective was to evaluate a strategic confinement with DTM *ad libitum* (T21) during the first 21 days postpartum (dpp) compared to a group that accessed grazing and received DTM after delivery (T0), on the uterine environment at 60 dpp. At 22 dpp T21 was managed together with T0 up to 60 dpp. An endometrial biopsy was taken at 60 dpp (approximately day 7 of the estrous cycle), following an estrus synchronization. We used an untargeted ¹H NMR metabolomics approach to understand the uterine microenvironment. The results suggest a metabolic effort after the management change in T21 to sustain the high milk production, indicated by several metabolites associated with the mobilization of body reserves and probable destination to gluconeogenesis. The data demonstrate the long-term impact of adaptation to lactation

on uterine functionality.

INTRODUCCIÓN

El balance energético negativo (BEN) fisiológico característico en los primeros días postparto ha sido ampliamente estudiado y asociado negativamente con la producción, salud y reproducción [1]. Estrategias nutricionales han sido evaluadas para disminuir su magnitud y duración, y se ha constatado que vacas en sistemas pastoriles presentan un mayor BEN que vacas confinadas [2]. El ambiente uterino al momento del desarrollo embrionario temprano es determinante en el mantenimiento de la preñez y está asociado al balance energético de los animales [3]. Sin embargo, aún es poco comprendido el efecto residual del balance energético en el postparto temprano sobre el ambiente uterino al momento de realizar los servicios. En este sentido, el análisis de metabolómica permite determinar la presencia de una amplia gama de metabolitos que pueden relacionarse con las vías metabólicas activas. El objetivo de este trabajo fue comparar los efectos de un manejo nutricional estratégico durante los primeros 21 días postparto con un sistema de base pastoril inmediato al parto sobre la producción de leche, la condición corporal y el metaboloma endometrial a los 60 dpp, en vacas lecheras.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en la Estación Experimental Dr. Mario A. Cassinoni (EEMAC), de la Facultad de Agronomía, UdelaR; Paysandú, Ruta 3 km 363. Luego del parto, se distribuyeron vacas Holando en bloques completos al azar, entre dos tratamientos nutricionales: **T0** (n=11), pastoreo+suplementación con DTM, y **T21** (n=13), estabulación en *compost barn* con DTM *ad libitum* durante los primeros 21 dpp (periodo directo). A los 22 dpp los animales T21 recibieron el mismo manejo nutricional que

T0 hasta los 60 dpp (periodo residual). El DTM estuvo compuesta por ensilaje de maíz o sorgo de planta entera, heno de moha, grano de maíz, harina de soja, harina de colza, expeller de girasol, cascarilla de soja, afrechillo de trigo, DDGS, núcleo de vitaminas y minerales. Los recursos forrajeros fueron: pradera de tercer año de *Medicago sativa*, pradera de primer año de *Festuca arundinacea*, pradera de primer año de *Chichorium intybus*, *Trifolium pratense* y *Lolium multiflorum*, y verdeo anual de *Lolium multiflorum*. La composición de la dieta compuesta y el consumo estimado es presentado en la Tabla 1.

La producción de leche se registró diariamente y la condición corporal (CC) fue evaluada semanalmente por el mismo observador según la escala de Edmonson et al. [4]. A los 40 dpp se realizó ultrasonografía ovárica para determinar ciclicidad y se realizó una sincronización de celo con dos dosis de cloprostenol (Estrumate[®], MSD, Argentina) 500 µg/animal separadas por 11 días. El día 60 postparto (alrededor del día 7 del ciclo estral), se tomaron biopsias de endometrio por vía transcervical, del cuerno ipsilateral al ovario con cuerpo lúteo, determinado por ultrasonografía. Las mismas fueron colocadas inmediatamente en crioviales y conservadas en nitrógeno líquido a -196 °C [5]. Una vez descongeladas, las muestras fueron trituradas con Ultraturrax. Se agregó 300 µL de buffer fosfato salino (PBS), se agitó y se centrifugó por 10 minutos a 13,8 G, retirando el sobrenadante que se congeló a -20 °C. Los extractos acuosos de endometrio se dejaron

Tabla 1. Composición química de la dieta compuesta (pastura+DTM) o solo DTM¹, relación pastura:DTM, y consumo estimado para los tratamientos T0 y T21 en el periodo directo (0-21 dpp) y residual (22-60 dpp)

	T0	T21	T0 & T21
	0 - 21 dpp		22-60 dpp
MS (%)	44,5	50,2	42,0
PC (%)	15,8	17,1	15,3
FDN (%)	32,9	33,3	33,5
FDA (%)	17,2	26,9	18,0
Cenizas (%)	8,4	7,4	8,9
ENL (Mcal/kgMS)	1,74	1,52	1,66
Pastura:DTM	40:60	0:100	42:58
Consumo DTM (kgMS/v/d) ²	12,3	25,6	11,5
Consumo pastura (kgMS/v/d) ³	8,1	-	9,6
Consumo total (kgMS/v/d)	20,4	25,6	20,0

¹ Composición química solo de DTM en el caso del tratamiento T21 en el periodo directo

² Consumo estimado según oferta, rechazo y desperdicio

³ Consumo estimado por balance de energía

descongelar a temperatura ambiente y se mezclaron alícuotas de 200 µL con 430 µL de buffer fosfato pH 7,4 en D2O y se transfirieron a tubos de RMN de 5 mm (NE HL5 7, New Era Enterprises Inc., Vineland, NJ, USA). Los espectros de ¹H RMN y el procesamiento de datos se realizó acorde a lo reportado por López Radcenco et al. [6]. La producción de leche se analizó por Proc Mixed y la CC mediante Proc Glimmix (SAS OnDemand) teniendo como efectos fijos al tratamiento, el periodo (directo y residual) y sus interacciones. Se consideraron diferencias significativas cuando P<0,05 y tendencia entre 0,05 y 0,10.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La producción de leche fue afectada por la interacción entre tratamiento y periodo (P<0,01), ya que durante las primeras tres semanas que se aplicó, el tratamiento T21 tendió a presentar mayor producción de leche que T0 (37,4 vs 34,0 L/vaca/día, respectivamente, P=0,08). Según la bibliografía este efecto está asociado a una mayor densidad de nutrientes energéticos que favorecen la fermentación propiónica y consecuente síntesis de glucosa y producción de leche [7]. En el periodo residual no se encontraron diferencias significativas en producción de leche. La condición corporal no presentó diferencias significativas, siendo en promedio para todo el periodo experimental de 3,1 ± 0,04 para ambos tratamientos.

El efecto del tratamiento durante los primeros 21 días postparto también se reflejó en el útero. En el endometrio obtenido al día 60 postparto, los datos derivados de los espectros de ¹H RMN muestran la distribución agrupada de los individuos acorde a los tratamientos (T0-rojo, T21-verde) por medio del Análisis de Componente Principal – PCA (Figura 1).

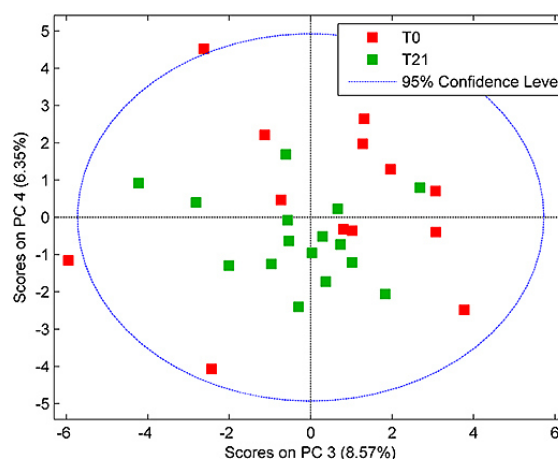


Figura 1. Gráfico de Análisis de Componente Principal de muestras de endometrio a día 60 postparto para todas las vacas de los tratamientos T0 (rojo) y T21 (verde)

Se realizó una comparación entre tratamientos mediante análisis discriminante de mínimos cuadrados ortogonales parciales - OPLS-DA (Figura 2a). Los coeficientes R^2Y y Q^2Y fueron 0,9 y 0,25, respectivamente, y su curva ROC obtuvo un valor de AUC de 0,81. En el gráfico de valores de carga (Figura 2b) se identificaron señales de resonancia que indican mayores concentraciones endometriales de lactato, glicina e isoleucina en T0 (picos negativos), mientras que en T21 se visualizaron mayores concentraciones de acetato, acetoacetato, betaína, colina, creatina (picos positivos). El lactato fue el metabolito mayormente afectado por el tratamiento: los menores niveles de lactato en endometrio de vacas T21 podrían estar asociados a una mayor utilización del mismo como precursor de la neoglucogénesis, para sostener los altos niveles de producción de leche alcanzados. Mientras que las vacas T0 debieron realizar la adaptación a la lactancia con precursores provenientes de la pastura y DTM, las vacas T21 debieron adaptarse a una menor proporción de fermentación propiónica por disminución de DTM en el periodo residual [8], probablemente captando mayor lactato de los tejidos periféricos. Esta partición de nutrientes diferencial es consistente con las mayores concentraciones de acetoacetato y acetato encontrados en el metaboloma endometrial de T21 que se asocian a una mayor cetogénesis para sostener altos niveles de producción con deficiencia energética [9]. En este mismo sentido, la movilización de reservas musculares podría explicar el aumento en la creatina en metaboloma endometrial de vacas T21 [10]. El aumento de betaína podría ser una respuesta compensatoria a esta situación, ya que se ha demostrado que esta promueve la síntesis proteica y la pérdida de masa muscular en otros modelos experimen-

tales [11]. A su vez, la betaína se forma en el organismo mediante oxidación de la colina que también se encuentra aumentada en el metaboloma de T21.

Mayor investigación es necesaria para comprender el impacto de estos mecanismos sobre la funcionalidad del endometrio y su relación con el éxito reproductivo en las vacas lecheras.

CONCLUSIONES

El manejo nutricional diferencial (DTM vs pastoreo+DTM) durante los primeros 21 días posparto tendió a afectar la producción de leche en la lactancia temprana y el metaboloma endometrial a los 60 días posparto. Estos hallazgos sugieren que el manejo nutricional podría tener un efecto a mediano plazo sobre la funcionalidad uterina.

REFERENCIAS

1. Meikle, A.; de Brun, V.; Carriquiry, M.; Soca, P.; Sosa, C.; Adrien, M. de L.; Chilibroste, P.; Abecia, J.A. *Anim. Reprod.* **2018**, *15*, 899–911, doi:10.21451/1984-3143-AR2018-0017.
2. Kolver, E.S.; Muller, L.D. *J. Dairy Sci.* **1998**, *81*, 1403–1411, doi:10.3168/jds.S0022-0302(98)75704-2.
3. Walsh, S.W.; Williams, E.J.; Evans, A.C.O. *Anim. Reprod. Sci.* **2011**, *123*, 127–138, doi:10.1016/j.anireprosci.2010.12.001.
4. Edmonson, A.J.; Lean, I.J.; Weaver, L.D.; Farver, T.; Webster, G. *J. Dairy Sci.* **1989**, *72*, 68–78, doi:10.3168/jds.S0022-0302(89)79081-0.
5. Meikle, A.; Sahlin, L.; Ferraris, A.; Masironi, B.; Blanc, J.E.; Rodríguez-Iraozqui, M.; Rodríguez-Piñón, M.; Kindahl, H.; Forsberg, M. *Anim. Reprod. Sci.* **2001**, *68*, 45–56, doi:10.1016/S0378-4320(01)00143-9.

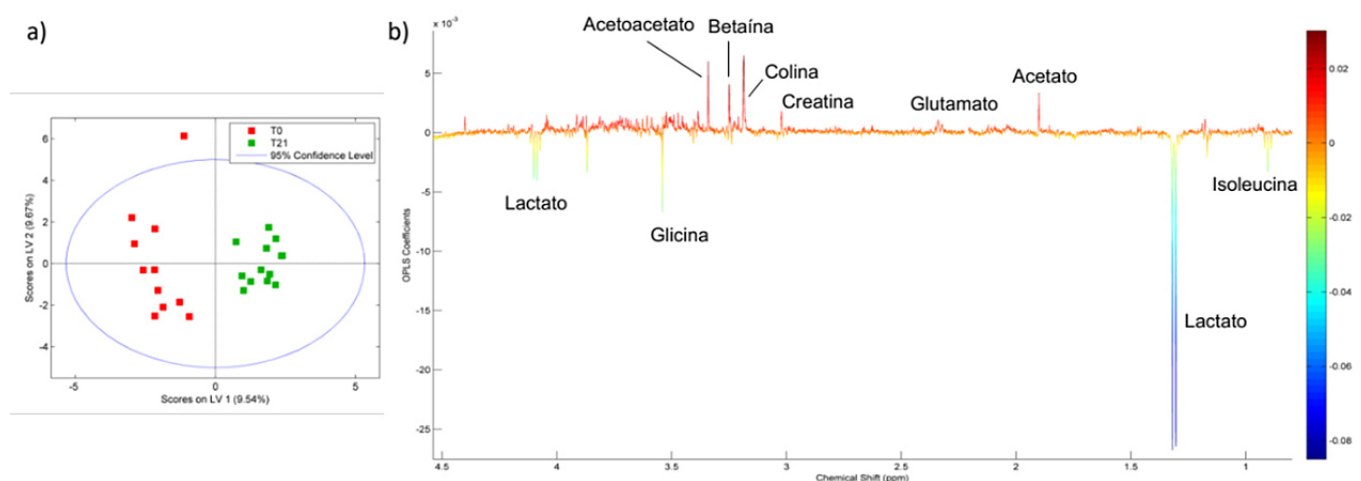


Figura 2. Gráfico de análisis discriminante de mínimos cuadrados ortogonales parciales [OPLS DA, (a)] y su respectivo gráfico de valores de carga (b)

6. López Radcenco, A.; Adrien, M. de L.; Rupprechter, G.; de Torres, E.; Meikle, A.; Moyna, G. *Dairy* **2021**, 2, 356–366, doi:10.3390/dairy2030028.
7. Bargo, F.; Muller, L.D.; Delahoy, J.E.; Cassidy, T.W. *J. Dairy Sci.* **2002**, 85, 2948–2963, doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74381-6.
8. Larsen, M.; Kristensen, N.B. *Animal* **2013**, 7, 1640–1650, doi:10.1017/S1751731113001171.
9. Baumgard, L.H.; Collier, R.J.; Bauman, D.E.. *J. Dairy Sci.* **2017**, 100, 10353–10366, doi:10.3168/jds.2017-13242.
10. Castillo, C.; Herna, J.; Lo, M. *Res. Vet. Sci.* **2006**, 80, 133–139, doi:10.1016/j.rvsc.2005.06.003.
11. Chen, S.; Lu, X.T.; He, T.T.; Yishake, D.; Tan, X.Y.; Hou, M.J.; Luo, Y.; Long, J.A.; Tang, Z.H.; Zhong, R.H.; et al. *Mol Nutr Food Res.* 2021; Vol. 65; ISBN 8620873318.