



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

Escuela
de Doctorado

TESIS DOCTORAL

*Avances en la aplicación de marcadores de salud
y bienestar en saliva en el ganado vacuno de leche*

AUTOR/A Pedro Javier Vallejo Mateo

DIRECTOR/ES Elsa Cristina Carona de Sousa Lamy
 María Dolores Contreras Aguilar
 Lorena Franco Martínez

2025



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

Escuela
de Doctorado

TESIS DOCTORAL

*Avances en la aplicación de marcadores de salud
y bienestar en saliva en el ganado vacuno de leche*

AUTOR/A Pedro Javier Vallejo Mateo

DIRECTOR/ES Elsa Cristina Carona de Sousa Lamy
 María Dolores Contreras Aguilar
 Lorena Franco Martínez

2025



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR/A

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19 de octubre de 2022.

Yo, D. Pedro Javier Vallejo Mateo, habiendo cursado el Programa de Doctorado ciencias veterinarias de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Murcia (EIDUM), como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor/a titulada:

Avances en la aplicación de marcadores de salud y bienestar en saliva en el ganado vacuno de leche

y dirigida por:

D.: Elsa Cristina Carona de Sousa Lamy

D.: María Dolores Contreras Aguilar

D.: Lorena Franco Martínez

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

Murcia, a 06 de septiembre del 2025

(firma)

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados:	
Responsable	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la quinta hoja, después de la portada de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor/a.

“Sueña con metas altas y volarás como las águilas. Eso debes hacer, alcanzar las cumbres de la vida. Busca al que sea sabio y aprende con él. Usa bien la ambición sin por ello dañar a nadie. No hagas que tengan que recriminarte en tu trabajo, hazlo siempre bien. E intenta ganar cuando te hagan competir. No te dejes avasallar por nadie y aunque hayas nacido en un hogar humilde, no te consideres por ello indigno. Si luchas con esfuerzo, conseguirás todo lo que te propongas”

— Gonzalo Giner, El sanador de caballos

AGRADECIMIENTOS

Es muy difícil el poder plasmar en unos cuantos párrafos todos los agradecimientos que pasan por mi cabeza. Hace 17 años que empezó mi aventura, una aventura llena de conocimiento y de saber, de todo aquello referente a la ciencia de la medicina veterinaria. Este camino ha ido marcado por el esfuerzo y el trabajo continuo, por las largas tardes de estudio, aprovechando cualquier periodo vacacional para poder llegar a ser lo que sin duda alguna me apasiona en la vida, SER MÉDICO VETERINARIO.

En este largo camino, he ido encontrándome con muchas personas, hoy en día amigos y compañeros de profesión, pero además de ellos, me han marcado mucho ciertos profesores y tutores que a lo largo de mi formación han estado a mi lado, enseñándome lo que es la verdadera docencia, el amor por la ciencia y los animales, y es por ello que quiero resaltar la figura imprescindible en este proyecto de aquellos profesionales que conforman el equipo de *INTERLAB UMU* de la universidad de Murcia.

Dentro de este equipo, agradecer de todo corazón a mis directoras de tesis ***María Dolores Contreras Aguilar*** y ***Lorena Franco Martínez*** todas las horas dedicadas a este trabajo, todos los nervios y todos los malos ratos que haya podido causar. El compatibilizar trabajo y estudio, como es mi caso, es muy complicado, pero sin ellas, esto hubiera sido imposible de realizar. Han sido dos pilares que han apuntalado muy fuerte este trabajo.

A ***José J. Cerón***, tutor de la tesis, por haberse fijado en mí, desde mi etapa de estudiante en la asignatura “Patología clínica”, hasta día de hoy, siendo un pilar fundamental en mi desarrollo dentro del mundo científico y docente. Al igual que las directoras, ha sido el cimiento desde donde se ha edificado esta tesis.

Además, agradecer a *Luis Pardo Marín*, técnico de laboratorio, así como al resto de personas que conforman el equipo, por toda la espera a la hora de recepcionar las muestras.

No puedo olvidar a todos mis ganaderos de vacuno lechero, los cuales siempre me han abierto las puertas de sus granjas para la toma de muestras, cediéndome sus vacas en todo momento que haya sido necesario. Mención especial a *Antonio Martínez Mercader* y *Antonio Bolea Hernández*, por acogerme en su casa, por brindarme su confianza en mis primeras andanzas dentro del mundo laboral, y por prestarme de forma desinteresada sus vacas, aquellas que me han dado todo dentro de la veterinaria.

Hay un proverbio birmano que dice que "*En tiempos de prueba, la familia es lo mejor*". Es por ello por lo que no puedo dejar de agradecer a mis *padres, hermana y abuela* el amor y apoyo incondicional recibido a lo largo de toda mi trayectoria estudiante y profesional. Han sido fundamentales desde todos los aspectos posibles que uno pueda imaginar.

No puedo olvidarme de mi mujer, compañera de vida y de profesión, María. Gracias a su amor y empatía desinteresada, he podido ir superando los obstáculos que cada día iban apareciendo en el trabajo y durante este periodo de doctorado. Agradecer también a mi familia política *García-Legaz Martínez* todos los ánimos y sabios consejos, en especial al ya difunto *Dr. Antonio Martínez Hernández*, médico anestesista que tanto influyó en mí en sus últimos años.

Dijo una vez Albert Einstein, el más grande de los científicos de su tiempo, que la "*LA RELIGIÓN SIN CIENCIA ESTÁ COJA, PERO LA CIENCIA SIN RELIGIÓN ES CIEGA*". Dar gracias a Dios, por mostrarme el camino correcto y ponerme a todas las personas que han contribuido al desarrollo de esta tesis en mi camino.

Muchas gracias a todos.

— ***Pedro J. Vallejo Mateo.***

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	10
2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	12
3. OBJETIVOS.....	18
4. MATERIAL Y MÉTODOS	20
4.1. ANIMALES.....	20
4.2. TOMA DE MUESTRAS	24
4.3. ANÁLISIS	26
4.3.1. Hematología.....	26
4.3.2. Bioquímica en saliva y sangre	27
4.3.3. Análisis proteómico	28
4.4. VALIDACIONES	29
4.4.1. Validación analítica.....	29
4.4.2. Validación clínica	29
4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	30
4.5.1. Cálculo del tamaño de muestra.....	31
5. CAPÍTULO 1: cambios en saliva ocasionados por la presencia de alimento.	32
6. CAPÍTULO 2: saliva como una potencial fuente de biomarcadores en vacas con metritis.	41
7.CAPÍTULO 3: Estudio del proteoma salivar en vacas con metritis.....	46
8.DISCUSIÓN GENERAL	52
9.CONCLUSIONES.....	70
10.REFERENCIAS	72
Apéndices	85

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades relacionadas con el periparto y la inmunidad en el vacuno lechero cada día cobran más importancia en la producción lechera, ya que muchas de las pérdidas económicas que se producen en las explotaciones ganaderas son debido a procesos patológicos de base inmunitaria y tienen un origen en la fase de secado y transición antes del parto. Según Leblanc (2010), aproximadamente el 75% de las enfermedades en el ganado lechero ocurren en el primer mes posparto, y el 50% del ganado lechero sufren enfermedades metabólicas e infecciosas en el periodo de transición (Leblanc, 2010). Otros estudios apuntan que, durante el periodo posparto temprano, aproximadamente una de cada dos vacas experimentará al menos un evento de salud adverso (Ferguson, 2005).

Entre los siete y diez días antes del parto, aunque en algunos casos hasta las dos semanas previas, se produce una disminución de la ingesta de materia seca (IMS) de aproximadamente un 30 % (Hayirli *et al.*, 2002). Esta bajada de la ingesta es el mejor predictor del balance energético negativo (BEN) en el bovino lechero. Esta situación desencadena una serie de cambios metabólicos y hormonales que predispondrá la aparición de ciertas enfermedades como cetosis, metritis o mastitis, entre otras. Hay estudios en los que se ha relacionado dichas patologías con el estrés oxidativo, resultado del desequilibrio entre la producción de radicales libres por parte del metabolismo celular y la falta de antioxidantes como resultado directo del aumento de la tasa metabólica y de la insuficiente función hepática, pues dicha producción está comprometida en esta fase (Goff and Horst, 1997).

Además, los cambios metabólicos y hormonales que ocurren antes del parto se relacionan con una disminución de la inmunidad y con aumento de la inflamación. Se ha observado un aumento de la haptoglobina (Hp) como factor relacionado con la disminución de la IMS (Piñeiro *et al.*, 2019). Actualmente no se sabe si esta proteína de fase aguda es causa o efecto de dicha disminución de la IMS. Sin embargo, podría servir como indicador predictor de infección o inflamación y, por tanto, de ciertas patologías

como metritis o endometritis previo al parto, y también un indicador objetivo de respuesta a la terapia (Ramírez V. *et al.*, 2002).

El uso de otros fluidos diagnósticos diferentes a la sangre como métodos no invasivos y poco estresantes para evaluar el estado de salud animal está tomando fuerza actualmente (Contreras-Aguilar, Vallejo-Mateo, *et al.*, 2020). Un ejemplo es la saliva, en la que recientemente se han validado métodos automatizados en el vacuno de leche para la evaluación de biomarcadores relacionados con el estrés, inmunidad, estado oxidativo, y del metabolismo general y daño hepático, muscular y renal (Contreras-Aguilar, Vallejo-Mateo, *et al.*, 2020); o como fluido para el descubrimiento de nuevos biomarcadores mediante técnicas proteómicas (Franco-Martínez *et al.*, 2021). Sin embargo, actualmente estos biomarcadores en saliva de vaca no han sido evaluados en conjunto como biomarcadores de diagnóstico y monitorización en procesos patológicos frecuentes en el postparto como, por ejemplo, la metritis. El uso de saliva en sustitución de la sangre en el vacuno de leche evita un manejo doloroso, estresante y/o invasivo. Por ello, estaría acorde con un manejo más respetuoso hacia los animales y a los estándares de *Animal Welfare*. Cabe señalar que la consideración de lo que los animales experimentan tiene un papel clave en el pensamiento científico contemporáneo sobre el bienestar animal (Mellor, 2016). Además, la recolección de saliva no requiere de personal especializado, pudiendo ser recogida por el personal de la granja (Contreras-Aguilar *et al.*, 2019). Por tanto, incrementa la posibilidad de muestreos en el ámbito ganadero para el diagnóstico/monitorización de enfermedades en casos de sospecha, favoreciendo el bienestar animal al incrementar el control de su salud.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

IMPACTO DE LA METRITIS EN EL GANADO VACUNO DE LECHE

Aproximadamente el 75% de las enfermedades en el ganado lechero ocurren en el primer mes posparto, y el 50% del ganado lechero sufren enfermedades metabólicas e infecciosas en el periodo de transición (Leblanc, 2010). Otros estudios apuntan que, durante el periodo posparto temprano, aproximadamente una de cada dos vacas experimentará al menos un evento de salud adverso (Ferguson, 2005). Según Gilbert, la incidencia de metritis clínica oscila entre el 15 y el 20%, aunque podría ser mayor según el rebaño (Gilbert, 2016). La metritis se suele producir en los 10 días posteriores al parto, siendo más frecuente durante la primera semana. El BEN en el periodo periparto aumenta el riesgo de enfermedades posparto como la retención de placenta, fiebre de la leche, metritis, mamitis, cetosis y desplazamiento de abomaso (Dohoo and Martin, 1984; Duffield *et al.*, 2009; Leblanc, 2010). Varios estudios han demostrado que estas enfermedades causan grandes pérdidas económicas al aumentar los costes en el diagnóstico, tratamiento, al disminuir la producción de leche y el rendimiento reproductivo en los rebaños lecheros. La metritis clínica afecta negativamente a la rentabilidad de la ganadería, debido a la reducción de la producción de leche (Rajala and Gröhn, 1998), a un retraso en el tiempo hasta la concepción (Fourichon, Seegers and Malher, 2000) y por el aumento de la tasa de sacrificio (Gröhn *et al.*, 2003). Por lo tanto, la metritis clínica podría considerarse un problema de bienestar.

La metritis clínica es la infección de todas las capas del útero, caracterizado por la presencia de un útero agrandado y flujo vaginal maloliente de color marrón rojizo, con o sin la presencia de signos sistémicos como fiebre, anorexia o depresión (Barragan *et al.*, 2018) dentro de los 21 días posteriores al parto (Sheldon *et al.*, 2006). Por ello, la detección de la descarga vaginal de vacas lecheras en fase de posparto es una práctica común para determinar, no sólo la presencia de metritis clínica, sino también su gravedad, que se puede medir subjetivamente evaluando color, proporción de material purulento y olor (Sheldon *et al.*, 2006).

Atendiendo a su severidad, Sheldon clasificó la enfermedad en 3 grados (Sheldon et al, 2019):

- Metritis grado I: Descarga vaginal purulenta, útero anormalmente agrandado, pero sin ningún otro síntoma de enfermedad.
- Metritis grado II: Descarga vaginal purulenta, útero anormalmente agrandado, y otros síntomas de enfermedad de tipo sistémico como bajada de la producción láctea y fiebre.
- Metritis grado III, también llamada metritis puerperal o metritis tóxica: Descarga vaginal purulenta, útero anormalmente agrandado y síntomas de toxemia, como anorexia, extremidades frías, depresión e incluso colapso.

Sin embargo, en algunas ocasiones estas descargas uterinas no son evidentes y se requiere realizar una exploración vaginal para poder diagnosticarlas. Este método de exploración es per se, un método invasivo, estresante, doloroso y requiere manipulación del animal. Además, aquellas vacas con metritis clínica experimentaron dolor visceral en respuesta a la palpación del útero (Stojkov et al., 2015). Por ello, reducir las manipulaciones resultará beneficioso para la vaca, no solo desde el punto de vista de manejo, si no también desde el bienestar animal.

CAMBIOS EN EL ESTADO OXIDATIVO, METABÓLICO, INMUNITARIO E INFLAMATORIO EN METRITIS

La vaca, tras el parto, experimenta una bajada en su sistema inmunitario, con lo que tiene más riesgo a padecer diferentes enfermedades, entre ellas, la metritis. Además, las bacterias que colonizan del útero son capaces de producir toxinas que son absorbidas por el animal, pudiendo producir toxemia aguda en los casos más graves. (Sheldon *et al.*, 2006).

En condiciones fisiológicas, el organismo suele tener suficientes reservas de antioxidantes para hacer frente a la producción de radicales libres (Miller, Brzezinska-Slebodzinska and Madsen, 1993; Castillo *et al.*, 2001), que se producen de forma continua durante el metabolismo y pueden aumentar como resultado de alteraciones patológicas y otras circunstancias (Róth, 1997). Sin embargo, cuando la generación de radicales libres excede la capacidad de producción de antioxidantes del organismo, se desarrolla el estrés oxidativo. En las vacas lecheras, el parto y las primeras etapas de la lactación son especialmente críticos y presentan desafíos fisiológicos considerables para la homeostasis, al imponer factores de estrés metabólico que pueden contribuir a la aparición de diferentes trastornos (Goff and Horst, 1997). Grummer estableció ese periodo entre las 3 semanas antes del parto y las 3 semanas después del parto (Grummer, 1995). La mayoría de las enfermedades infecciosas y metabólicas ocurren durante este tiempo. La inmunosupresión durante este periodo crítico conduce a una mayor susceptibilidad de otras patologías, como, por ejemplo, la mastitis o metritis (Drackley, 1999).

Sin embargo, varios autores han demostrado que vacas en periodo de posparto temprano con metritis clínica presentaban concentraciones más altas de haptoglobina (Hp) que aquellas que no presentaban (Drillich *et al.*, 2007; Chan *et al.*, 2010; Pohl, Burfeind and Heuwieser, 2015), y otros autores han sugerido que las concentraciones de Hp antes y después del parto podrían usarse como predictor de metritis clínica (Huzzey *et al.*, 2009). La Hp bovina es una proteína macro-molecular fijadora de hemoglobina que es indetectable en suero de bovino sano, pero aparece durante la fase de inflamación aguda (Young *et al.*, 1996). La concentración de Hp en sangre incrementa rápidamente como consecuencia de daño debido a infección microbiana o inflamación. Esto reafirma la idea de que las vacas en el periodo periparto experimentan una respuesta inflamatoria sistémica considerable pudiendo ser evaluada mediante la medición de Hp.

USO DE MUESTRAS NO INVASIVAS

Se define como muestra no invasiva aquella obtenida mediante métodos que ocasionan mínimo dolor o estrés en los individuos (Casal *et al.*, 2017; Everding, 2021) y, por tanto, todas aquellas que eviten de la necesidad del uso de agujas o técnicas quirúrgicas para la obtención de muestras. Algunos de estos ejemplos son el pelo, las heces, la orina (mediante micción espontánea), la leche o la saliva.

En el caso del pelo y para las especies ganaderas como es el vacuno de leche, la evaluación de biomarcadores se ha centrado en las últimas décadas en aquellos relacionados con el estrés, como es la evaluación de glucocorticoides (Vesel *et al.*, 2020). La medición algunos de estos glucocorticoides como son el cortisol o corticosterona en el pelo tiene la ventaja de reflejar la activación del eje Hipotálamo-Hipófisis-adrenal (HPA) durante un periodo de tiempo (semanas o meses) sin estar influenciada por episodios de estrés agudos, por lo que es una técnica muy válida para la evaluación del estrés crónico (Vesel *et al.*, 2020). Sin embargo, no permite medir biomarcadores relacionados con la inflamación, inmunidad o metabolismo general. Esta desventaja también la comparte la evaluación en heces de biomarcadores de estado de salud o estrés, en la que solo glucocorticoides, otras hormonas sexuales o catecolaminas pueden ser medidos y, además, las muestras deben ser recolectadas de manera inmediata debido al efecto de la rápida descomposición bacteriana (Palme, 2012; Tallo-Parra *et al.*, 2014; Vesel *et al.*, 2020). Por otro lado, aunque en orina o leche se ha demostrado la posibilidad de evaluar procesos inflamatorios, inmunitarios o metabólicos en diferentes especies (De Loor *et al.*, 2013; Barcarolo *et al.*, 2022; Bilić *et al.*, 2023; Botía *et al.*, 2024), la evaluación de estos biomarcadores en estos fluidos tiene como desventaja la no posibilidad de controlar el momento de su obtención: en el caso de la orina, y en concreto en la especie objeto de esta tesis, su recolección por micción espontánea la hace dificultosa por manejo; y en el caso de la leche solo pueden evaluarse en periodos de producción, quedando fuera periodos tan importantes para el control de salud del ganado vacuno de leche como es el de transición (Leblanc, 2010).

Sin embargo, la saliva es un fluido que ha generado interés en los últimos años para la evaluación de biomarcadores de salud y bienestar en animales domésticos y de granja por varios motivos. Algunos de ellos son que, además de que su forma de recolección es no invasiva y de bajo costo, sus métodos de muestreo son fáciles, permitiendo la recolección de muestras múltiples/repetidas en cualquier momento, en cualquier lugar y sin necesidad de personal especializado (Contreras-Aguilar *et al.*, 2019). La saliva contiene una variedad de compuestos que pueden cambiar en patologías locales y sistémicas, y pueden proporcionar información sobre los cambios fisiopatológicos que ocurren en una enfermedad (Yoshizawa *et al.*, 2013; Cuevas-Córdoba and Santiago-García, 2014). En esta línea, la medición de un perfil de analitos en saliva (“sialoquímica”) se puede incluir de la misma forma que un perfil bioquímico realizado en suero o plasma (Contreras-Aguilar, Vallejo-Mateo, *et al.*, 2020). Este hecho permite explorar un número relativamente alto de analitos que podría ser de interés para evaluar diferentes enfermedades en el vacuno lechero.

ESTUDIOS PROTEÓMICOS EN EL DIAGNÓSTICO DE METRITIS EN EL GANADO VACUNO

Las técnicas de análisis avanzados como la proteómica de alta resolución ofrecen la posibilidad de descubrir una batería de potenciales candidatos de la condición que nos interese, ya que nos permite identificar en un único análisis el contenido proteico de una muestra, conocido como proteoma. Así, una aproximación común es analizar el proteoma en varios individuos con la condición de interés, y comparar los resultados con un grupo control (Almeida *et al.*, 2015). De este modo, las proteínas que se encuentran en distinta proporción entre los dos grupos pueden ser analizadas con mayor detenimiento usando otras técnicas en etapas posteriores de la investigación, incluyendo estudios de validación clínica y analítica.

Estas técnicas han mostrado un potencial número de aplicaciones en ciencias veterinarias, tanto en clínicas y en producción animal (Almeida *et al.*, 2015). Existen estudios donde se han analizado los proteomas salivales en ganado vacuno sano y se ha sugerido que la expresión de proteínas en este fluido en vacas podría ser útil para la

detección de estadios de infección en enfermedades infecciosas como la paratuberculosis (Mallikarjunappa *et al.*, 2019). En otro estudio se describieron cambios en la abundancia de un total de sesenta y tres proteínas al comparar las salivas de vacas con mastitis con las de un grupo de vacas sanas (Franco-Martínez *et al.*, 2021), demostrando la potencial aplicación del uso de la proteómica en saliva del ganado vacuno. Además, se han descrito otros cambios en el proteoma de distintos fluidos en vacas en diferentes situaciones como estrés por calor (Min *et al.*, 2016), o en estudios de que evaluaban fertilidad (Aranciaga *et al.*, 2020), o parámetros de la producción de leche (Eckersall, 2019), entre otros. En relación con la metritis en vacas, se han descrito cambios proteómicos en las vesículas extracelulares del fluido uterino al compararse el proteoma con el de un grupo control (Piibor *et al.*, 2024). Sin embargo, a pesar de la importancia de las enfermedades en la fase de periparto y posparto en el vacuno lechero como la metritis, no se han encontrado estudios que evalúen los proteomas en saliva y suero en vacas dentro de este contexto.

3. OBJETIVOS

La hipótesis principal de esta tesis doctoral fue que la saliva es un biofluido que podría ser adecuado para detectar alteraciones en el estado de salud y bienestar en el ganado vacuno con metritis. El uso de saliva, al ser una muestra no invasiva, tendría una serie de ventajas con respecto al uso de suero, como que permite un muestreo más seguro, sencillo, indoloro y menos estresante para el animal. Además, existe bibliografía reciente que respalda el potencial de la saliva en el diagnóstico de otras patologías del vacuno lechero, como ante cojeras o mastitis (Contreras-Aguilar *et al.*, 2019; Contreras-Aguilar, Vallejo-Mateo, *et al.*, 2020).

Por lo tanto, esta tesis doctoral tiene como objetivo principal evaluar en la saliva del ganado vacuno de leche posibles biomarcadores útiles para el diagnóstico de la metritis. Para ello, se establecen los siguientes objetivos secundarios:

1. Valorar las interferencias que se puede producir en la saliva para evaluar el estado de salud y bienestar en el ganado vacuno de leche.
2. Evaluar si el uso de saliva puede ser de interés para el diagnóstico de metritis en el ganado vacuno de leche:
 - a. Empleando un perfil bioquímico en saliva (sialoquímica), adaptando y validando métodos que se pueden medir de manera rutinaria en sangre. Esto podría permitir evaluar de manera no invasiva el estado de salud del animal y tener un mayor conocimiento sobre la fisiopatología de la enfermedad
 - b. Describiendo por primera vez las posibles diferencias en el perfil proteico salivar entre vacas sanas y vacas con metritis utilizando un enfoque proteómico. Este enfoque permitirá identificar potenciales biomarcadores de diagnóstico salivares para la metritis bovina.

Para abordar estos objetivos, la presente Tesis está estructurada en tres Capítulos, que se describen brevemente a continuación:

El **Capítulo 1** se centra en evaluar la posible interferencia ocasionada por la presencia de comida en la boca del animal, que podría dar lugar a restos y color en la saliva, en la medida de marcadores en este fluido. Para evaluar esta problemática, 24 biomarcadores se midieron en pools de salivas de vacas sanas mezcladas con diferentes alimentos in vitro (premezcla, pasto y heno) y se compararon con los resultados obtenidos en dicho pool de salivas obtenidas tras lavar la boca a las vacas. Además, se incluyen una serie de recomendaciones para limitar la contaminación de saliva con comida.

El **Capítulo 2** aborda el estudio de una serie de marcadores salivares, típicamente medidos en suero, en vacas sanas y vacas con metritis, una vez tenidas en cuenta las consideraciones del Capítulo 1 para obtener muestras limpias. Este estudio analiza las diferencias entre animales sanos y con metritis en un total de 25 biomarcadores en saliva, y los resultados se discuten con relación a los resultados de hematología, bioquímica sérica y parámetros de la exploración clínicos.

En el **Capítulo 3**, una vez confirmados los cambios en la composición salival en vacas con metritis con respecto a vacas sanas, se realiza un estudio proteómico con técnicas de alta sensibilidad. Se identifican todos los cambios en el proteoma que se producen en la saliva en vacas con metritis con un doble objetivo: por un lado, identificar posibles nuevos biomarcadores de la enfermedad en saliva y, por otro, obtener una visión más completa de los cambios fisiopatológicos que ocurren en metritis, que se traducen en una mejor comprensión de la enfermedad.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los procedimientos y estudios llevados a cabo en la presente tesis doctoral han sido aprobados por el comité de Bioética de la Universidad de Murcia (España), con la identificación 171/2015.

4.1. ANIMALES

Los animales estudiados en la presente tesis doctoral son vacas de la raza frisona, pertenecientes a una granja comercial ubicada en la Región de Murcia (38°2' N, 1°15' W).

Los animales son alimentados con ensilaje de avena (36,65% de la materia seca (MS)), heno de avena (31,41%), bagazo de cebada (20,94%), subproducto de colza (torta de colza) (7,33%), maíz molido (3,14%) y una premezcla mineral. Su composición de nutrientes (% de MS = 52,0%) fue de 1,21 Mcal/kg de Energía Neta por lactación (EN_L), 33,90% de Digestibilidad Estimada (ADF), 44,84% de Fibra Detergente Neutra (NDF), 13,87% de proteína cruda, 4,74% proteína soluble, 8,72% de proteína degradable (RDP), y 5,15% de proteína no degradable (RUP). Los animales disponen de alimento y agua *ad libitum*. Los animales se encuentran estabulados en grupos de 80 a 100 vacas, en estabulación al aire libre, con cama fría y se ordeñan 3 veces al día. Además, en épocas de estrés térmico, cuentan con sistemas de refrigeración donde reciben duchas diarias para combatir el calor.

La granja está calificada como T3H, B4, libre de tuberculosis y brucelosis bovina, además de leucocitosis bovina, pleuroneumonía contagiosa bovina y lengua azul (LA). Las vacas se encuentran vacunadas frente al virus de la diarrea vírica bovina (BVD), rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR); virus de la parainfluenza bovina-3 (PI3) y virus sincitial respiratorio bovino (VRSB). Durante la fase de secado se inmunizan frente a rotavirus, coronavirus bovino y *E. coli* k99, para prevenir el síndrome diarreico neonatal.

En todos los casos, previo al muestreo, los animales fueron examinados por el doctorando, que ejerce como veterinario de la explotación. Como parte de la evaluación

clínica, los siguientes parámetros fueron evaluados en todos los animales en el día de su muestreo.

- Edad.
- Número de lactación
- Días en leche
- Escala de depresión: medida mediante una escala adaptada de un estudio previo [16], tal y como se muestra en la **Figura 1: Puntuación para la evaluación clínica de la deshidratación y acidosis** (Dillane *et al.*, 2020). **Figura 1.** Se basa en la inspección visual del comportamiento, posición de las orejas, la movilidad, el interés en el entorno, el consumo de alimento y el enoftalmos, utilizando una escala de 5 puntos con incrementos de 1 punto, donde 1 indicaba ausencia de depresión y 5 indicaba depresión severa.

	0 Clínicamente normal	1 Leve	2 Moderada	4 Severa	5 Grave
					
					
Comportamiento:	Alerta, responde	Decaído, responde levemente	Decaído, deprimido, responde muy ligeramente	Marcadamente deprimido, no responde	No responde a ningún tipo de estímulo
Orejas:	Alerta y móviles	Ligeramente decaídas	Caidas	Caidas y sueltas	Marcadamente caídas y sueltas
Mobilidad:	Activo y capaz de pararse por su cuenta	Se para y camina por su cuenta luego de estimularlo	Capaz de mantenerse de pie y caminar luego de levantarlo	Recumbencia esternal, incapaz de pararse	Recumbencia lateral, incapaz de pararse
Interés en los alrededores:	Reflejo de succión fuerte	Reflejo de succión disminuido	Reflejo de succión débil	Movimientos de Masticación	Ausente
Consumo de alimento:	Alimentándose bien	Toma lentamente y podría no terminar lo que se le ofrece	Reducción en el consumo de alimento	No consume alimento	No consume alimento
Enoftalmo deshidratación:	Ojos brillosos	Ojos ligeramente hundidos	Ojos moderadamente hundidos	Ojos hundidos	Ojos marcadamente hundidos

Figura 1: Puntuación para la evaluación clínica de la deshidratación y acidosis (Dillane *et al.*, 2020).

- Condición corporal (*body condition score*, BCS): medido mediante una escala del 1 al 5, con incrementos de 0,25 puntos (Edmonson *et al.*, 1989), **Figura 2** Un valor 1 se les asigna a animales extremadamente delgados, mientras que un valor de 5 indica que el animal presenta obesidad).

	SCORE	Spinous processes (SP) (anatomy varies)	Spinous to Transverse processes	Transverse processes	Overhanging shelf (care - rumen fill)	Tuber coxae (hooks) & Tuber ischia (pins)	Between pins and hooks	Between the hooks	Tailhead to pins (anatomy varies)
SEVERE UNDERCONDITIONING (emaciated)	1.00	individual processes distinct, giving a saw-tooth appearance	deep depression	very prominent, > 1/2 length visible	definite shelf, gaunt, tucked	extremely sharp, no tissue cover	severe depression, devoid of flesh	severely depressed	bones very prominent with deep "V" shaped cavity under tail
	1.25								
	1.50								
FRAME OBVIOUS	1.75			1/2 length of process visible					
	2.00	individual processes evident	obvious depression	between 1/2 to 1/3 of processes visible	prominent shelf	prominent	very sunken		bones prominent "U" shaped cavity formed under tail
	2.25								
FRAME & COVERING WELL BALANCED	2.50	sharp, prominent ridge		1/3 - 1/4 visible	moderate shelf		thin flesh covering	definite depression	first evidence of fat
	2.75								
	3.00		smooth concave curve	< 1/4 visible	slight shelf	smooth	depression	moderate depression	bones smooth, cavity under tail shallow & fatty tissue lined
FRAME NOT AS VISIBLE AS COVERING	3.25			appears smooth, TP's just discernable					
	3.50	smooth ridge, the SP's not evident	smooth slope	distinct ridge, no individual processes discernable		covered	slight depression	slight depression	
	3.75								
SEVERE OVERCONDITIONING	4.00	flat, no processes discernable	nearly flat	smooth, rounded edge	none	rounded with fat	sloping	flat	bones rounded with fat and slight fat-filled depression under tail
	4.25								
	4.50			edge barely discernable		buried in fat	flat		bones buried in fat, cavity filled with fat forming tissue folds
	4.75								
	5.00	buried in fat	rounded (convex)	buried in fat	bulging		rounded	rounded	

Figura 2: Grados de condición corporal (Edmonson *et al.*, 1989).

- Temperatura corporal: valor de referencia (media, (mínimo -máximo)): 38,5 (37,7 – 39) °C
- Frecuencia cardíaca: valor de referencia 60 (40-80) latidos por minuto.
- Frecuencia respiratoria: valor de referencia 23 (10-30) respiraciones por minuto
- Color de las mucosas: mucosas de color rosadas, con un tiempo de relleno capilar inferior a 2 segundos.

- Motilidad ruminal: valor de referencia 2-3 contracciones del saco dorsal/ minuto.
- Descarga vaginal: en condiciones fisiológicas, puede estar ausente o haber presencia de moco de aspecto filante, transparente y abundante.
- Producción lechera: dependerá de los sistemas de producción, manejo, alimentación, raza etc.

Si, a juicio del veterinario (el doctorando Pedro Javier), algún animal requería de algún tratamiento, este se administraba con posterioridad a la recogida de muestras para impedir que pudiese influir en los resultados analíticos. Atendiendo a la historia clínica y a la exploración externa, los siguientes grupos de animales fueron empleados en esta tesis doctoral:

- Animales clínicamente sanos: animales que presentan una exploración clínica normal, incluyendo frecuencia cardíaca y respiratoria dentro de los rangos fisiológicos descritos anteriormente.
- Animales con metritis: animales con signos clínicos compatibles con metritis según la literatura científica (Sheldon *et al.*, 2006), como son un útero aumentado de tamaño, posible presencia de descarga vaginal fétida, y signos de enfermedad sistémica como menor producción lechera, signos de toxemia, y apatía, dentro de los 21 días postparto.

En todos los casos, las vacas con signos compatibles a otros procesos como laminitis, cetosis (evaluado mediante el análisis de beta hidroxibutirasa $<0,8\text{mmol/L}$) o mastitis agudas o con signos de malestar después de la evaluación clínica fueron descartados del estudio. También se excluyeron del estudio aquellos animales que hubieran presentado signos de enfermedad en los últimos tres meses. En los estudios donde se emplearon animales sanos y con metritis, por cada animal con metritis, un animal sano en un similar estado productivo y del mismo grupo de estabulación fue muestreado en el mismo día.

4.2. TOMA DE MUESTRAS

Todas las muestras fueron tomadas por el doctorando, posteriormente a la exploración clínica y antes de aplicar ningún tratamiento.

Para facilitar la toma de muestra, las vacas muestreadas se inmovilizan en las colleras o cepos (sistemas de inmovilización en la zona de comedero) y no se les ofrece alimento durante la toma de muestra para evitar la contaminación de saliva con la comida. La inmovilización de las vacas en las colleras no supone una situación de estrés para el animal, ya que se realiza de manera habitual para realizar los exámenes clínicos de rutina.

Con el objetivo de obtener salivas lo más limpias posibles, antes de la recogida de saliva se realiza un lavado de boca, de manera similar a la descrita para caballos (Contreras-Aguilar, Hevia, *et al.*, 2020) (**Figura 3**).



Figura 3 Ejemplo de toma de muestra de saliva en una vaca en las colleras

Al menos tres minutos después del lavado de boca, se introduce una esponja de polipropileno de $5 \times 2 \times 2$ cm aproximadamente (Esponja Marina, La Griega E. Koronis, Madrid, España) en el vestíbulo bucal y debajo de la lengua, sujetándola con una varilla metálica fina y flexible. Se mueve por la boca del animal hasta que esté completamente húmeda, dado que las glándulas salivales parótida y sublingual son las más desarrolladas en el vacuno (Vázquez-Autón J et l., 2022). Una vez que la esponja está completamente humedecida de saliva, las esponjas se colocan en un dispositivo comercial de recolección de saliva (Salivette ®, Sarstedt, Aktiengesellschaft & Co, Nümbrecht, Alemania). Por último, se limpia con papel el material de recolección (varilla metálica) para muestrear a otro animal con una nueva esponja. Las muestras se mantienen refrigeradas con placas de hielo hasta su llegada al laboratorio, que fue en menos de dos horas en todos los casos.

Una vez en el laboratorio, los tubos Salivette ® conteniendo las esponjas con saliva son centrifugados ($3000 \times g$ durante 10 minutos, a $4^{\circ}C$) de manera que la saliva cae hacia el segundo compartimento del tubo recolector. Después, se recoge el sobrenadante en tubos Eppendorf de 1,5 mililitros y se almacenan a $-80^{\circ}C$ hasta su análisis.

En aquellos animales en los que también se muestreó sangre (Capítulos 2 y 3), ésta siempre se realizó posteriormente a la recogida de saliva. La sangre se muestreó por venipuntura de la vena caudal. Se emplearon tubos con gel activador de la coagulación (Tapval, Aquisel, Barcelona, Spain) para la obtención de suero, y tubos con EDTA para los análisis hematológicos y de fibrinógeno. La sangre se almacenó junto a la saliva refrigeradas hasta su llegada al laboratorio, dentro de las dos horas siguientes. Después, la sangre de los tubos EDTA fue analizada inmediatamente (ADVIA 120 Hematology Analyzer; Siemens Healthcare GmbH; Erlangen, Alemania), mientras que la contenida en los tubos con activador de la coagulación fue centrifugada ($3000 \times g$ durante 10 minutos, a $4^{\circ}C$), y el suero se almacenó en tubos Eppendorf de 1.5 mililitros a $-80^{\circ}C$ hasta su análisis.

4.3. ANÁLISIS

En animales con sospecha de enfermedad, las muestras se analizaron inicialmente con un perfil completo de hematología y bioquímica al momento de su llegada al laboratorio. Esto permitió evaluar su estado de salud y facilitar el rápido diagnóstico y tratamiento.

Sin embargo, y de cara a los estudios de esta tesis doctoral, para minimizar la variabilidad inter-ensayo, todas las muestras incluidas en los estudios fueron medidas nuevamente en una única ejecución analítica, a excepción de la hematología. Esto permitió estandarizar los resultados y garantizar una mayor consistencia en los datos obtenidos.

4.3.1. Hematología

Los hemogramas se realizaron a partir de sangre EDTA, inmediatamente después de su recepción, usando un analizador automático (ADVIA 120 Hematology Analyzer; Siemens Healthcare GmbH; Erlangen, Alemania).

En concreto, se evaluaron los siguientes parámetros:

- Serie roja: hematíes, hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), contenido de hemoglobina (CH), amplitud de distribución eritrocitaria (RDW), ancho de distribución de hemoglobina eritrocitaria (HDW), reticulocitos.
- Serie blanca: valores porcentuales y absolutos de leucocitos segmentados, cayados, linfocitos, monocitos, eosinófilos, y basófilos.
- Serie plaquetaria: número de plaquetas, volumen plaquetario medio (MPV), porcentaje de plaquetas (PCT), distribución del tamaño de las plaquetas (PDW), concentración media plaquetaria (MPC), distribución del contenido plaquetario (PCDW), masa plaquetaria media (MPM), dispersión de la masa plaquetaria (PMDW), plaquetas grandes (Large PLT).

4.3.2. Bioquímica en saliva y sangre

En el caso de los análisis bioquímicos de saliva y suero, se realizaron dos tipos diferentes de análisis:

- (a) Ensayos espectrofotométricos o turbidimétricos utilizando un analizador bioquímico automático (Olympus AU600 / AU400, Beckman Coulter, Ennis, Irlanda).
- Biomarcadores de estrés (solo en saliva): esterasas totales (TEA), alfa-amilasa salival, butirilcolinesterasa (BChE) y lipasa (Lip).
 - Inmunidad e inflamación: adenosina desaminasa (ADA), amiloide A sérico (SAA), fibrinógeno (medido en muestras con EDTA) y ferritina.
 - Estado oxidativo: capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC), ensayo de poder antioxidante reductor férrico (FRAP, en suero; FRAS, en saliva), capacidad antioxidante de reducción cúprica (CUPRAC), ácido úrico y productos avanzados de oxidación de proteínas (AOPPs).
 - Metabolismo general y daño hepático, muscular y renal (enzimas, proteínas y minerales): ácidos grasos no esterificados (NEFAs), proteínas, albúmina, bilirrubina, creatina quinasa (CK), γ -glutamyl transferasa (gGT), aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina (ALP), creatinina, urea, triglicéridos, glucosa, lipasa, amilasa, lactato, lactato deshidrogenasa (LDH), fósforo, calcio y hierro.
- (b) Métodos inmunológicos internos utilizando tecnología AlphaLISA (PerkinElmer, Inc., Hopkinton, MA, EE.UU.) con un lector de placas de fluorometría de 96 pocillos (PerkinElmer, Inc., Hopkinton, MA, EE.UU.)
- Biomarcadores de estrés: cortisol.
 - Inflamación: Hp.

4.3.3. Análisis proteómico

El análisis proteómico se realizó siguiendo el protocolo descrito previamente en saliva y suero de vacas (Martínez-Subiela *et al.*, 2017; Franco-Martínez *et al.*, 2021), usando un kit comercial Tandem Mass Tags (TMT, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Para cada tipo de muestra (saliva y suero), se hizo un pool consistente en 35 µg de cada individuo y se procesó junto al resto de muestras, siendo empleado como control interno (IS). De manera resumida, por cada muestra y control interno, 35 µg de proteína fueron sometidos a un protocolo de precipitación con acetona, reducción, alquilación y digestión con tripsina, siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, cada muestra fue marcada con un reactivo del kit comercial, evaporada y mantenida a -80°C. Las muestras fueron enviadas a Internal Disease Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb (Croacia), para su análisis de cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas, utilizando el equipo Dionex Ultimate 3000 RSLC nano flow system (Dionex, Camberley, UK) acoplado a Orbitrap Q Exactive Plus mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (Horvatić *et al.*, 2019).

Tras la identificación y cuantificación relativa de las proteínas, los resultados fueron enfrentados a la base de datos *Bos taurus* (Uniprot /Swissprot on 15_07_2024) usando Proteome Discoverer (version 2.0, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Para ello, se establecieron los siguientes parámetros: tolerancias de masa del precursor y del fragmento de 10 ppm y 0,02 Da, dos sitios de corte de tripsina perdidos, modificación estática de carbamidometilación (C), oxidación (M) como modificación fija de péptido, desamidación (N, Q) y modificaciones dinámicas de TMT (K, y N-terminal del péptido). La tasa de descubrimiento falso (FDR) para la identificación de péptidos se calculó utilizando el algoritmo Percolator. Las proteínas con al menos dos péptidos únicos y 1% de FDR se consideraron correctamente identificadas.

4.4. VALIDACIONES

4.4.1. Validación analítica

Debido a que la mayoría de los biomarcadores utilizados en la presente tesis doctoral no habían sido validados previamente en suero o saliva de vacas, todos los métodos fueron validados analíticamente para asegurar que el resultado obtenido sea lo más cercano posible al valor real de una muestra.

Para ello, se evaluó la precisión y la exactitud (Kjelgaard-Hansen and Jacobsen, 2011) en al menos dos muestras analíticas (una con concentración del analito a analizar alta y otra con concentración baja), tal y como se detalla:

- La precisión se calculó mediante el coeficiente de variación (CV) intra-ensayo. Para ello, una misma muestra es medida 5 veces en el mismo momento. El CV intra-ensayo se calculó dividiendo la desviación estándar (SD) de las mediciones repetidas de una muestra por la media aritmética de esas mediciones, y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje
- La exactitud de los ensayos se evaluó mediante el estudio de la linealidad bajo dilución, en la que una muestra de valor conocido se diluye secuencialmente desde 1:2 a 1:64 en agua ultrapura. Se realizó después un análisis de regresión comparando las concentraciones de analitos medidas con las concentraciones de analitos esperadas.
- El límite de detección se calculó como el valor medio de medición 10 medidas de agua más dos desviaciones estándar.

4.4.2. Validación clínica

Los estudios proteómicos realizados en el Capítulo 3 sugirieron que la calprotectina en saliva podría ser útil para diferenciar entre vacas sanas y vacas con metritis. Para evaluar esta hipótesis, se midió la calprotectina en saliva de vacas usando un kit comercial (BÜHLMANN fCal Turbo® immunoturbidimetric assay (BÜHLMANN

Laboratories AG, Switzerland)), de manera similar a la reportada anteriormente (López-Martínez *et al.*, 2023).

Como no se había utilizado este kit comercial para medir Calprotectina en saliva de vaca anteriormente, en primer lugar, se realizó una validación analítica, tal y cómo se describe en el apartado **4.4.1 Validación analítica**.

Tras comprobar que los resultados de la validación analítica estaban acordes con los límites recomendados, se realizó una validación clínica. Para ello, se midió Calprotectina en saliva en 12 vacas con metritis y en 23 animales sanos. Este tamaño de muestra se consideró con suficiente poder estadístico al realizar un análisis posterior (Kane S.P., 2024)

4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se muestran como mediana (percentil 25 – percentil 75%), al menos que se especifique lo contrario.

- La distribución de los datos fue evaluada mediante las pruebas de normalidad de D'Agostino, Shapiro–Wilk y Pearson. Cuando los datos no seguían una distribución normal, fueron transformados logarítmicamente o se emplearon análisis no paramétricos.
- Los cambios relativos (veces de cambio, *fold-changes*) se calcularon dividiendo la mediana del grupo 1, entre la mediana del grupo 2.
- Para realizar el análisis de ANOVA, se emplearon los datos transformados logarítmicamente. El análisis ANOVA evaluó si había diferencias: (1) en el Capítulo 1, entre las salivas incubadas con diferentes alimentos *in vitro*, la saliva limpia control, y su homólogo (saliva limpia) tras incubarse a 38°C; y (2) en el Capítulo 2, entre grupos de vacas sanas y con metritis, en relación con la condición corporal (BCS), o por la interacción del grupo-BCS.
- Las correlaciones fueron calculadas usando el análisis no paramétrico de Spearman.

- Para el análisis proteómico (Capítulo 3), primero se descartaron aquellas proteínas con menos de dos péptidos únicos. Se eliminaron los *outliers* significativos, detectados con Dixon's test. A partir de los datos proteómicos, se realizó un gráfico volcano para visualizar las variaciones en el proteoma entre animales sanos y con metritis, usando como criterios de inclusión un cambio de $>1,5$ y $P < 0,1$. (Kocharunchitt *et al.*, 2012).
- Para caracterizar los marcadores que mostraron cambios significativos en el análisis proteómico entre los grupos en saliva y suero, se realizaron análisis de enriquecimiento de ontología génica (GO) utilizando el complemento ClueGo de Cytoscape y sus funciones para fusionar y agrupar términos funcionalmente relacionados, con el fin de reducir la redundancia. Las ontologías utilizadas fueron actualizadas el 31 de agosto de 2024.
- En el estudio de validación clínica, se compararon las concentraciones de calprotectina entre las vacas sanas y las que presentaban metritis utilizando la prueba no paramétrica de Wilcoxon-Mann-Whitney.

En todos los casos, un valor de $P < 0,05$ se ha considerado como estadísticamente significativo. Los análisis estadísticos se han realizado usando Graph Pad Software Inc. (GraphPad Prism, version 9.1.0, San Diego, CA, USA) y RStudio (RStudio Team v3.2.2).

4.5.1. Cálculo del tamaño de muestra

Para el Capítulo 2, y con el fin de conocer el número de vacas necesario para obtener un poder estadístico adecuado para cada analito, se realizó un cálculo de tamaño de muestra a partir de los datos obtenidos de 5 vacas sanas y con metritis para garantizar un poder del 80% y un nivel de significancia del 5%. Para todos los analitos evaluados, se determinó que como mínimo serían necesarias 8 vacas por grupo.

5. CAPÍTULO 1: cambios en saliva ocasionados por la presencia de alimento.

Este trabajo ha sido publicado en BMC Veterinary Research: [DOI: 10.1186/s12917-022-03371-9](https://doi.org/10.1186/s12917-022-03371-9)

29

Objetivo del capítulo

Este estudio evaluó el efecto de la presencia de alimento en la saliva de vacas de leche para la medición de un perfil sialoquímico con el fin de dar evidencia científica de las condiciones en la que la saliva debería obtenerse en esta especie para evitar posibles interferencias.

Material y métodos

El muestreo de saliva se realizó entre las 9:30 y las 12:25 en diciembre 2020. La temperatura media fue de $18,5 \pm 2,33$ °C, y la humedad media $65,4 \pm 15,21\%$. Para este estudio, se muestrearon en cinco días diferentes cinco vacas sanas de la raza Holstein-Frisona de 2-8 años de edad, con BCS de 2,5-3, que se encontraban en periodo de secado (45 a 15 días antes de la fecha prevista del parto). Por tanto, finalmente se llevaron a cabo 25 muestreos.

Estas muestras fueron procesadas y mezcladas en un único pool de unos 50 mL aproximadamente, para posteriormente dividir las en cinco nuevas alícuotas, cada una a su vez en cinco réplicas, para llevar a cabo la prueba experimental *in vitro* tal y como se detalla en la **Figura 4**. La alícuota C1 se utilizó como control de saliva limpia sin tratamiento. Tres de las cinco alícuotas divididas en réplicas de 1,6 mL de saliva cada una fueron mezcladas con 250 mg de diferentes tipos de alimento:

- Premezcla: Alimento estándar empleado para vacas en periodo de lactancia (alícuota F, *feed*) basado en restos de brócoli, silo de avena, maíz molido, bagazo de cebada, silo de alfalfa, pulpa de maíz húmeda, subproducto de colza (pastel de

colza), alfalfa deshidratada, pulpa de remolacha seca, fuente de hidrógeno no proteico, paja de cebada y una mezcla mineral.

- Heno de trigo (alícuota H, *hay*)
- Pasto (alícuota G, *grass*)

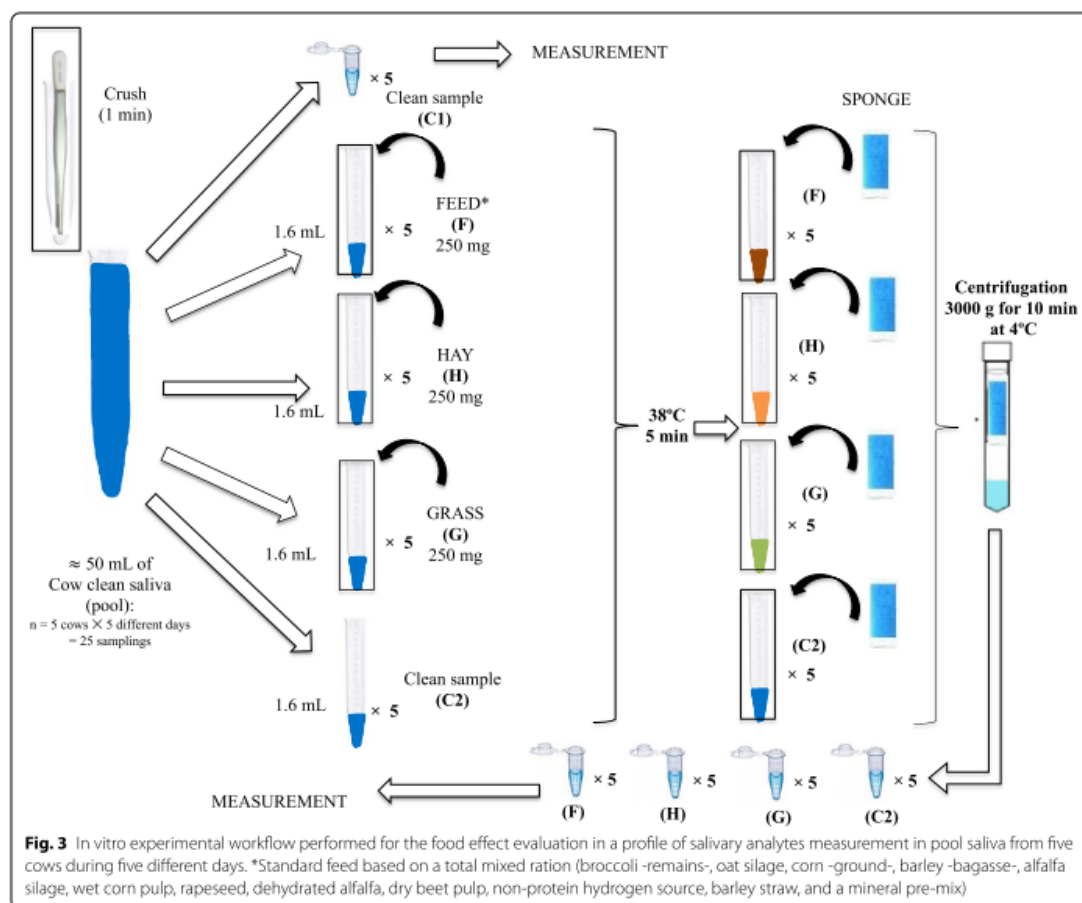


Figura 4: Representación de los protocolos realizados para realizar in vitro la simulación de la contaminación de saliva con diferentes alimentos.

El alimento en cada una de las réplicas F, H y G fue triturado con ayuda de una pinza y luego incubadas a 38 °C durante 5 minutos para simular la masticación. Finalmente, las cinco réplicas de la última alícuota (alícuota C2) fueron simplemente incubadas a dicha temperatura y tiempo sin ninguna contaminación con alimento con el fin de determinar si esta incubación pudiera ser un factor que pudiera interferir en la

medición de los analitos que se evaluarán posteriormente. Después, se introdujo una esponja de polipropileno en cada réplica de las cuatro alícuotas (F, H, G y C2) para absorber la saliva y luego pasarlo a diferentes tubos de Salivettes[®] que fueron centrifugados para obtener la muestra final de saliva. La saliva de cada réplica se traspasó a eppendorfs para poder ser analizadas. Adicionalmente, se repitió el mismo procedimiento usando agua ultrapura (MiliQ water) en lugar de saliva (alícuotas Fw, Hw, Gw, y C2w, respectivamente).

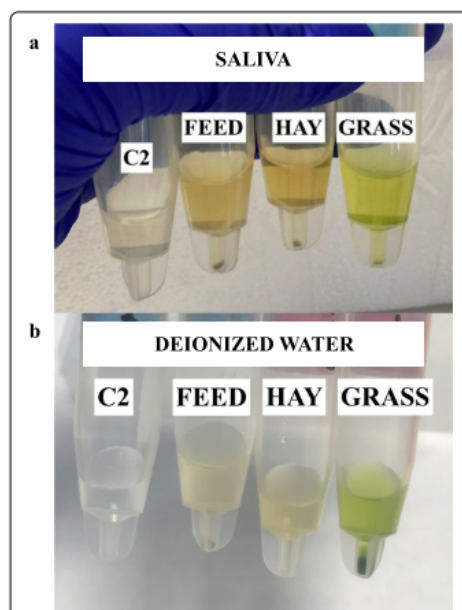


Figura 5: Cambios de color en la saliva (a) y agua destilada (b) tras la adición de los diferentes alimentos *in vitro*.

El perfil sialoquímico evaluado consistió en los siguientes analitos:

- Biomarcadores salivales: Cortisol, alfa-amilasa salival (sAA), BChE, TEA y Lip.
- Biomarcador de inmunidad: ADA
- Biomarcadores de estado oxidativo: TEAC, FRAS, CUPRAC, ácido úrico y AOPPs
- Analitos de metabolismo general y daño hepático, muscular y renal (enzimas, proteínas y minerales): AST; ALP, gGT, LDH, CK, creatinina, urea triglicéridos, glucosa, lactato, proteína total, fósforo y calcio total.

Además del análisis estadístico descrito en el punto tres del apartado 4.5, el CV de las medias de las alícuotas C2, F, H y G comparado con C1 se calculó en base a la siguiente fórmula:

$$\pm \frac{SD(\bar{x}C1, \bar{x}x) \times 100}{\bar{x}(\bar{x}C1, \bar{x}x)}$$

Donde $\bar{x}C1$ hace referencia a la media aritmética de las $\times 5$ réplicas medidas de la alícuota C1, y $\bar{x}x$ la media aritmética de las $\times 5$ réplicas medidas de las alícuotas C2, F, H o G. Un valor de CV positivo (+) o negativo (–) indica que, respectivamente, el valor medio obtenido de las alícuotas C1, F, H o G fue mayor o menor del de la alícuota C1. Coeficientes de variación mayores al 15% del valor de la alícuota de referencia (C1) se consideraron lo suficientemente altos como para determinar que ha ocurrido interferencias en las mediciones (CDER, 2001).

Resultados principales

Se observó un cambio en el color de la muestra en las salivas F, H, G, con respecto a C1, como se muestra en la **Figura 5a**. Cuando se usó agua ultrapura en lugar de saliva, el color de la muestra también cambió en todos los casos (Fw, Hw y Gw) con respecto al agua sin tratar C2w (**Figura 5b**).

En cuanto a los resultados analíticos, la mayoría mostraron diferencias significativas entre la alícuota de referencia C1 y las demás alícuotas con alimento (**Tabla 1**), y con CV superiores al 15% (**Figura 6**). Los mayores cambios se observaron en TEAC, FRAS, CUPRAC, AOPP, AST, LDH, glucosa y triglicéridos; mientras que cortisol, gGT, y CK no mostraron diferencias estadísticamente significativas. Al evaluar la adición de la premezcla (alícuota Fw), heno de trigo (alícuota Hw) o pasto (alícuota Gw) al agua con respecto a su homólogo en saliva (alícuotas F, H y G), no se encontraron diferencias en lipasa, ADA, TEAC, AST, LDH, urea, triglicéridos y lactato (**Tabla 1**).

Tabla 1: Medias y desviaciones estándar (SD) de las cinco réplicas de las mediciones del perfil sialoquímico en las alícuotas de saliva en vacas marcadas como C1 (saliva limpia), C2 (saliva limpia tras ser incubada durante 5 min a 38°C), F (saliva incubada con una premezcla normalmente ofrecida a vacas en lactación), H (saliva incubada con heno de trigo) y G (saliva incubada con pasto); y de las alícuotas de agua ionizada marcadas como C2w (agua incubada durante 5 min a 38°C), Fw (agua incubada con una premezcla normalmente ofrecida a vacas en lactación), Hw (agua incubada con heno de trigo) y Gw (agua incubada con pasto).

		29 SALIVA					P valor ¹	AGUA DESTILADA			
		C1	C2	F	H	G		C2w	Fw	Hw	Gw
Cortisol (µg/dL)	media	0,094	0,109	0,116	0,109	0,094	,461	,055 ^a _a	0,050 ^a _a	0,105	0,050 ^a _a
	SD	0,009	0,014	0,034	0,029	0,006		0,008	0,000	0,031	0,000
sAA (IU/L)	media	1,2	1,3	4,8 ^b	2,5 ^a	1,9 ^a	,001	0,2 ^a	2,1 ^a	0,9	1,1 ^a
	SD	0,5	0,6	1,1	0,8	0,4		0,3	0,6	0,2	0,5
BChE (nmol/mL/min)	media	15,3	14,7	21,4 ^a	14,2	22,8 ^a	,017	0,9 ^b _a	8,8 ^a _b	2,9 ^a _b	6,4 ^a _a
	SD	2,3	2,5	2,6	1,5	4,7		0,3	0,2	1,0	2,5
TEA (IU/L)	media	80,1	84,3	126,0 ^c	103,8 ^a	83,5	,006	0,0 ^d _d	13,3 ^c _b	14,8 ^d _b	9,6 ^c _b
	SD	0,83	3,80	7,99	15,72	3,05		0,00	2,67	0,55	1,08
Lip (IU/L)	media	5,7	3,9 ^a	0,0 ^d	2,5	3,1 ^b	,024	3,2 ^a _b	0,0 ^d	4,0	4,5
	SD	0,3	0,1	0,0	2,4	0,3		0,1	0,0	5,0	0,7
ADA (IU/L)	media	2,2	2,0	4,2 ^a	1,9	1,9 ^b	,003	0,1 ^c _c	4,7 ^b	0,5 ^a _a	0,4 ^b _a
	SD	0,0	0,1	1,2	0,7	0,2		0,1	0,4	0,5	0,3
TEAC (mmol/L)	media	0,053	0,056	0,580 ^c	0,591 ^c	0,320 ^a	<,001	0,000 ^d	0,405 ^b	0,410 ^b	0,688 ^a
	SD	0,001	0,002	0,078	0,127	0,165		0,000	0,025	0,047	0,238

Tabla 1: (continuación).

		SALIVA					AGUA DESTILADA				
		C1	C2	F	H	G	P	C2 _w	F _w	H _w	G _w
							valor ¹				
FRAS	media	0,101	0,095	0,739 ^c	0,959 ^a	0,572 ^c	< ,001	,000 ^c	0,512 ^{c_a}	0,690 ^a	1,466 ^b
(mmol/L)	SD	0,003	0,002	0,095	0,218	0,293		0,000	0,016	0,077	0,650
CUPRAC	media	0,099	0,101	0,561 ^d	0,635 ^c	0,371 ^a	< ,001	,047 ^{d_c}	0,407 ^{d_a}	0,485 ^b	0,847 ^{a_a}
(mmol/L)	SD	0,001	0,002	0,067	0,134	0,181		0,001	0,004	0,052	0,306
Ácido úrico	media	6,12	6,49	9,71 ^c	3,78 ^b	1,10 ^a	,001	5,12	2,38 ^{b_b}	0,00 ^{b_a}	0,00 ^b
(μmol/L)	SD	0,41	0,37	0,54	1,14	2,08		0,66	0,48	0,00	0,00
AOPP	media	51,3	37,2 ^b	434,6 ^c	401,9 ^b	386,9 ^a	,002	5,0 ^{c_b}	215,4 ^{b_a}	229,2 ^b	514,3 ^a
(μmol/L)	SD	2,9	3,6	67,8	142,9	203,8		1,4	11,5	33,9	230,1
AST	media	3,5	3,1	13,8 ^a	10,9 ^a	78,9 ^a	,021	0,2 ^{b_b}	8,9 ^a	28,7 ^{b_b}	322,5 ^{a_a}
(IU/L)	SD	0,6	0,2	5,6	4,3	44,8		0,3	2,9	5,2	160,3
ALP	media	22,6	17,6 ^b	22,4	33,8	19,5 ^b	,086	1,4 ^{c_c}	5,9 ^{c_b}	16,8 ^a	4,5 ^{b_b}
(IU/L)	SD	0,7	0,4	2,0	13,5	0,9		0,2	1,5	8,3	2,1
gGT	media	23,6	19,0 ^b	22,6	22,3	20,1 ^a	,063	1,5 ^{c_c}	3,0 ^{c_c}	2,5 ^{c_b}	2,4 ^{c_c}
(IU/L)	SD	0,7	0,5	0,7	1,6	0,9		0,1	0,2	0,6	0,2
LDH	media	24,2	23,8	60,0 ^b	24,9	24,7	,002	4,2 ^{b_b}	54,3 ^a	5,6 ^{a_a}	3,7 ^{b_b}
(IU/L)	SD	1,8	1,9	10,4	4,9	1,7		1,9	9,8	2,8	2,6
CK	media	2,1	1,9 ^b	2,1	3,6 ^a	43,0 ^c	,001	0,0 ^{c_b}	0,4 ^{a_a}	2,3	55,6 ^d
(IU/L)	SD	0,07	0,09	0,23	0,76	8,97		0,00	0,32	0,10	0,52
Creatinina	media	50,93	52,17	128,92 ^d	91,43 ^b	71,18 ^a	< ,001	0,59 ^{c_c}	77,51 ^{b_b}	20,63 ^{a_b}	25,05 ^{c_a}
(μmol/L)	SD	0,48	1,08	6,63	14,07	11,70		1,02	3,11	10,06	1,02

Tabla 1: (continuación).

		SALIVA					AGUA DESTILADA				
							<i>P</i>				
		C1	C2	F	H	G	valor ¹	C2 _w	F _w	H _w	G _w
Urea (mmol/L)	media	3,45	3,41 ^c	12,53 ^d	3,68 ^a	3,28 ^b	,002	0,00 ^{b_b}	11,92 ^c	0,13 ^{a_c}	0,00 ^{b_b}
	SD	0,06	0,14	0,72	0,37	0,37		0,00	1,71	0,11	0,00
Triglicéridos (mmol/L)	media	0,13	0,18 ^c	1,41 ^d	0,68 ^a	0,18 ^b	,002	0,06 ^{b_b}	1,38 ^c	0,36	0,11 ^a
	SD	0,00	0,01	0,12	0,40	0,01		0,01	0,04	0,15	0,02
Glucosa (mmol/L)	media	0,02	0,03 ^a	3,93 ^d	0,33 ^a	0,13	<,001	0,00 ^a	4,18 ^a	0,30 ^a	0,50 ^{a_a}
	SD	0,00	0,00	0,25	0,19	0,10		0,00	0,97	0,14	0,15
Lactato (mmol/L)	media	0,28	0,35	4,57 ^d	0,37	0,25	,001	0,03 ^{b_a}	4,71 ^d	0,09 ^{b_a}	0,02 ^{b_a}
	SD	0,00	0,06	0,28	0,09	0,04		0,02	0,99	0,03	0,03
Proteína total (g/L)	media	0,52	0,51	0,89 ^c	0,54	0,86 ^a	,014	0,01 ^{c_c}	0,12 ^{b_b}	0,04 ^{c_b}	0,80
	SD	0,01	0,02	0,06	0,03	0,25		0,00	0,03	0,01	0,40
Fósforo (mmol/L)	media	7,70	7,55	6,25 ^b	6,90 ^c	7,64	<,001	0,00 ^{c_d}	2,38 ^{b_b}	0,26 ^{c_b}	2,24 ^{b_b}
	SD	0,13	0,08	0,34	0,31	0,13		0,00	0,20	0,13	0,51
Calcio total (mmol/L)	media	0,33	0,08 ^b	1,18 ^d	0,53	0,19 ^a	<,001	0,00 ^{a_b}	3,40 ^{b_a}	0,79	0,93 ^{a_a}
	SD	0,08	0,01	0,07	0,17	0,06		0,00	0,51	0,37	0,23

¹Análisis de varianza de una vía de medidas repetidas (ANOVA) para evaluar si hay diferencias en los valores obtenidos entre la alícuota de saliva C1 (saliva limpia control), C2, F, H y G.

^{a,b,c,d} Las letras en superíndice indican diferencias estadísticas entre las alícuotas de saliva incubadas con la C1 en la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher sin corregir para comparaciones múltiples: a: $P < .05$; b: $P < .01$; c: $P < .001$; d: $P < .0001$.

^{a,b,c,d} Las letras en índices bajos indican diferencias estadísticas entre las alícuotas de agua C2_w, F_w, H_w y G_w con sus homólogos C2, F, H y G en saliva en la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher sin corregir para comparaciones múltiples: a: $P < .05$; b: $P < .01$; c: $P < .001$; d: $P < .0001$.

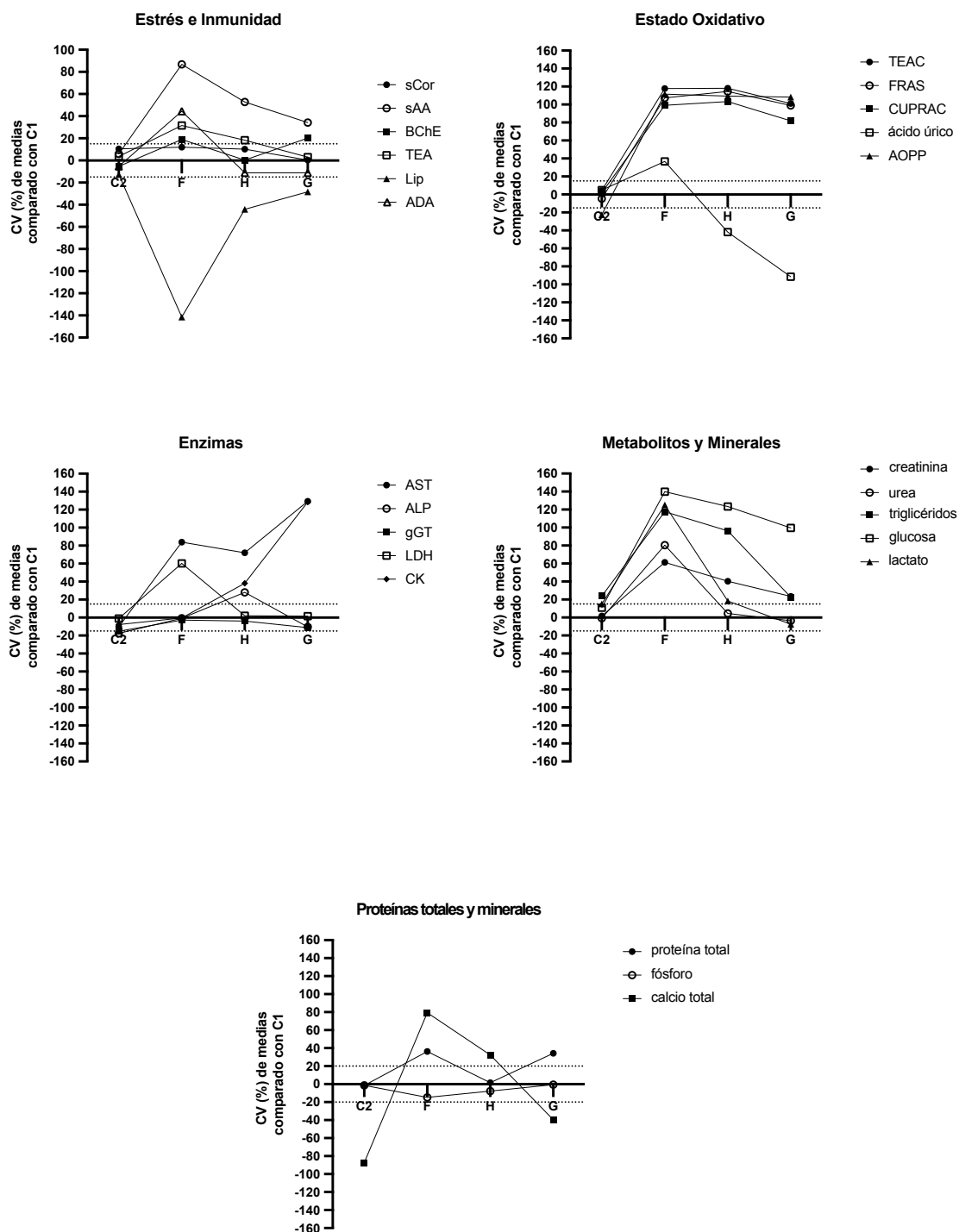


Figura 6: Coeficientes de variación (CV) de las medias ($n=5$) de las alícuotas C2 (pool de saliva de vacas sometido a incubación durante 5 min a 38°C), F, H y G (pool de saliva de vacas sometido a incubación con 250 mg de alimento basado en una premezcla estándar usado en vacas en lactación, heno de trigo y pasto, respectivamente) comparado con su alícuota de control C1 (pool de saliva limpia).

Este estudio tiene algunas limitaciones. Los resultados obtenidos en este informe deben tomarse con cautela, ya que están relacionados con la población de vacas muestreada: animales clínicamente sanos. Por lo tanto, deben realizarse estudios adicionales en otras poblaciones de vacas y en situaciones de enfermedades o estrés para comprobar si estos cambios debido a la presencia de alimento producen un efecto similar al de la muestra limpia, y si estas variabilidades pudieran enmascarar los cambios en los analitos salivales debido a estas situaciones. Además, se estableció un tiempo de incubación de cinco minutos para simular que el alimento estuviera alrededor del vestíbulo bucal o debajo de la lengua junto con la saliva durante aproximadamente este tiempo, aunque no se ha evaluado la influencia de otros tiempos de incubación.

6. CAPÍTULO 2: saliva como una potencial fuente de biomarcadores en vacas con metritis.

Este trabajo ha sido publicado en Veterinary Sciences: [DOI: 10.3390/vetsci11090446](https://doi.org/10.3390/vetsci11090446)

Objetivo del capítulo

En este capítulo se evalúa si existen biomarcadores dentro de un perfil sialoquímico que puedan mostrar alteraciones entre vacas sanas y con metritis.

Material y métodos

Los animales fueron muestreados para saliva y suero tal y como se describe en el apartado **4.2. TOMA DE MUESTRAS**. Para este estudio, las muestras se obtuvieron durante los meses de marzo a mayo de 2023. En concreto, se utilizaron muestras de 16 animales con metritis, de las cuales 4 presentaron signos de otras complicaciones como laminitis o cetosis, y fueron posteriormente descartadas del estudio. Un grupo de 16 vacas sanas de los mismos establos fueron seleccionadas, teniendo en cuenta que su edad, días postparto y número de lactación fueran similares a los registrados para el grupo de metritis.

Resultados principales

Los parámetros descriptivos de los animales que componen los dos grupos se pueden observar en la **Tabla 2**. Los animales con metritis presentaban menor producción láctea y motilidad ruminal, y mayor grado de depresión, frecuencia cardíaca y respiratoria, en relación al grupo control.

Tabla 2: *Parámetros descriptivos de los animales sanos y con metritis empleados en el Capítulo 2.*

Parámetro	Sanas (n=16)	Metritis (n=12)	P
Edad, años	4 (4 – 4,75)	4,5 (4 - 5)	0,420
Días en leche	12 (8 - 18)	16 (11,25 - 19)	0,113
Número de lactación	3 (3 - 4)	3 (2 - 6)	0,756
Producción láctea (Kg/día)	27,5 (19,25 – 36,5)	19,5 (5,75 - 30,5)	0,024
Condición corporal (1-5)	3 (2,19 - 3)	3 (2,75 - 3)	0,079
Grado de depresión (1-5)	1 (1 - 1)	2 (1 - 3)	0,001
Temperatura (°C)	38,55 (38,4 – 38,7)	38,8 (38,4 – 39,2)	0,224
Frecuencia cardíaca (lpm)	55 (48 - 62)	64 (60 - 78)	0,003
Frecuencia respiratoria (rpm)	24 (18,25 - 31)	36 (31 - 56)	0,006
Motilidad ruminal (1-3)	2 (2 - 3)	2 (1 - 2)	0,028

En primer lugar, se realizó una validación analítica para todos los marcadores que no habían sido analizados previamente en saliva y/o suero de vaca, según se describe en el apartado **4.4.1. Validación analítica**. Los resultados de la validación analítica se muestran en la **Tabla 3**. Tal y como se puede observar, en todos los casos, se observan coeficientes de linealidad cercanos a uno, y coeficientes de variabilidad intra-ensayo menores de 15%. Además, los valores observados en las muestras analizadas eran superiores a los límites bajos de detección.

Tabla 3: Biomarcador, origen de los reactivos y resultados de validación analítica (límite bajo de detección: LLOD, coeficiente de variabilidad intraensayo: CV y coeficiente de linealidad: R^2) para saliva y suero de vacas.

Biomarcador	Reactivos	LLOD	Saliva			Serum	
			CV	R2		CV	R2
Cortisol (ng/mL)	Home-made	0,22	8,2	0,98		7,2	0,98
TEA (UI/L)	Home-made	12,24	1,65	0,997		1,61	0,995
BChE ($\mu\text{mol/mL/min}$)	Home-made	0,0025	12,2	0,96		-	-
Amilasa (UI/L)	Beckman Coulter	0,002	6,46	0,951		1,26	0,994
Lipasa (UI/L)	Beckman Coulter	1	3,6	0,9783		2,3	0,991
ADA (UI/L)	Diazyme	0,07	2,44	0,982		1,4	0,991
Hp (mg/L saliva, g/L suero)	Home-made	0,0225	7,57	0,992		6,59	0,995
SAA ($\mu\text{g/mL}$)	Eiken (Vet-SAA)	0,2	-	-		6,3	0,98
Fibrinógeno (mg/dL)	Beckman Coulter	1	-	-		2,2	0,999
Ferritina ($\mu\text{g/L}$)	Beckman Coulter	6,4	-	-		4,98	1
TEAC (mmol/L)	Home-made	0,09	1,46	0,997		3,1	
FRAP (mmol/L)	Home-made	0,03	1,3	0,996		0,71	0,998
CUPRAC (mmol/L)	Home-made	0,003	0,79	0,993		0,86	0,994
Ácido úrico (mg/dL)	Beckman Coulter	0,031	2,35	0,999		1,44	0,999
AOPPs* ($\mu\text{mol/L}$)	Home-made	3,67	1,95	0,999		1,83	0,995
NEFAs (mmol/L)	Randox	0,07	-	-		1,83	1
proteínas (mg/dL saliva, g/dL suero)	Spinreact	0,1	2,37	0,999		4,6	1
Albumina (g/dL)	Beckman Coulter	0,07	-	-		2,06	0,999
Bilirrubina (mg/dL)	Beckman Coulter	0,39	-	-		8,66	0,998
gGT (UI/L)	Beckman Coulter	1	9,2	0,96		1,15	0,998
AST (UI/L)	Beckman Coulter	1	4,53	0,97		1,93	1
ALP (UI/L)	Beckman Coulter	1	1,82	0,97		4,74	0,998
CK (UI/L)	Beckman Coulter	1	9,63	0,962		1,97	1
Creatinina (mg/dL)	Beckman Coulter	0,04	1	0,996		5,41	0,998
Urea (mg/dL)	Beckman Coulter	0,78	3,08	0,999		3,78	0,988
Triglicéridos (UI/L)	Beckman Coulter	0,01	3,54	0,997		1,83	0,99
Glucosa (mg/dL)	Beckman Coulter	0,04	3,64	0,987		5,97	0,999
Lactato (mmol/L)	Beckman Coulter	0,01	1,55	0,999		3,69	0,989
LDH (UI/L)	Biosystem	3	3,34	0,996		1,06	1

Fósforo (mg/dL)	Beckman Coulter	0,31	1.28	0,999	6.27	0,997
Calcio (mg/dL)	Beckman Coulter	0,12	1.85	0,998	4.73	0,983
Hierro (µg/L)	Beckman Coulter	0.3	-	-	6.78	0.999

Esterasa total (total esterase (TEA)), butiril-colinesterasa (butyryl-cholinesterase (BChE)), adenosine deaminase (adenosine deaminase (ADA)) haptoglobina (haptoglobin (Hp)), amiloide A sérica (serum amyloid A (SAA)), capacidad antioxidante equivalente a Trolox (trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)), poder antioxidante reductor del hierro férrico (ferric reducing antioxidant power assay (FRAP)), capacidad antioxidante reductora del cobre cúprico (cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC)), productos de oxidación proteica avanzada (advanced oxidation protein products (AOPPs)), ácidos grasos no esterificados (non-esterified fatty acids (NEFAs)), gamma-glutamyl transferasa (γ-glutamyl transferase (gGT)), aspartato aminotransferasa (aspartate aminotransferase (AST)), fosfatasa alcalina (alkaline phosphatase (ALP)), creatina quinasa (creatine kinase (CK)), lactato deshidrogenasa (lactate dehydrogenase (LDH)).

Al comparar los parámetros descriptivos entre los dos grupos, el grado de depresión, frecuencia cardíaca y frecuencia respiratoria fueron mayores en las vacas con metritis. Por contra, la producción de leche y la motilidad ruminal fueron mayores en el grupo control. La hematología reveló mayores niveles de eosinófilos en las vacas con metritis.

Al evaluar los resultados en los biomarcadores en saliva, se observaron niveles más altos en lipasa, ADA, Hp, proteínas, gGT, AST, ALP, y CK en las vacas con metritis. En la bioquímica sérica, se encontraron valores estadísticamente más altos en vacas con metritis en ADA, Hp, SAA, fibrinógeno, ferritina, NEFA y bilirrubina, mientras que TEA, albúmina, urea, lactato, fósforo y calcio presentaron niveles menores.

Por último, cuando se evaluó la posible correlación de cada biomarcador entre saliva y suero, se encontraron correlaciones positivas y estadísticamente significativas para Hp, FRAP, CUPRAC, AOPP (AOPP en saliva con respecto al ratio AOPP/albúmina

en suero), urea y fósforo. Sin embargo, de entre todos los anteriores, sólo urea mostró un coeficiente de correlación fuerte, con $R > 0,7$.

Entre las limitaciones del capítulo se encuentra un tamaño de muestra relativamente pequeño, aunque los análisis preliminares y *post-hoc* demostraron que el poder estadístico fue suficiente. Aun así, sería recomendable una validación adicional de las diferencias observadas entre vacas sanas y vacas con metritis con un mayor número de animales y el uso de curvas ROC. En segundo lugar, solo se incluyeron vacas lecheras de una raza y granja en particular, por lo que no se evaluaron posibles influencias de la raza, el estado energético o los patrones de manejo (como variaciones en el alojamiento, ordeño o manejo nutricional de los animales). Por último, sería de gran interés la realización de estudios adicionales para determinar si los biomarcadores analizados aquí también podrían ser de interés para la prevención o como biomarcadores predictivos de metritis.

7.CAPÍTULO 3: Estudio del proteoma salivar en vacas con metritis

Objetivo del capítulo

En este estudio, se evaluó el proteoma de vacas sanas y vacas con metritis, con el objetivo de identificar potenciales nuevos biomarcadores de la enfermedad en saliva y suero, y obtener más información sobre la patofisiología de la enfermedad.

Material y métodos

Para la realización de este estudio se usaron 10 muestras pareadas de suero y saliva del capítulo 2 (Vallejo-Mateo *et al.*, 2024), seleccionando 5 muestras de animales sanos y 5 muestras de animales con metritis. Las muestras de saliva y de suero fueron analizadas por separado, tal y cómo se detalla en el apartado **4.3. ANÁLISIS**.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los animales de los dos grupos en la edad, días en leche, número de lactación, grado de depresión o temperatura. Sin embargo, mayores frecuencias cardíaca y respiratoria, SAA, y menor producción láctea fueron descritas en el grupo de metritis (**Tabla 4**).

Tabla 4: Signos clínicos y concentración de SAA individuales de los animales usados para el estudio proteómico del Capítulo 3.

ID	Años	Condición corporal	Días en leche	Número lactación	Producción Láctea	Grado de depresión	Temperatura	Frecuencia cardíaca	Frecuencia respiratoria	Motilidad ruminal	Descarga vaginal	SAA suero
M1	4	2,75	14	2	12	1	38,8	64	59	2	P	17,2
M2	4	3	2	2	5	2	39,5	60	44	1	P	101,8
M3	5	3	11	4	6	1	39,4	87	32	2	P	54,8
M4	4	2	18	3	7	1	38,4	60	60	2	P	24,8
M5	5	2,75	17	4	16	4	38,2	69	40	1	P	36,8
H1	4	3	9	3	17	1	38,9	48	24	3	A	2,3
H2	5	3	11	4	21	1	38,4	55	24	3	A	1,8
H3	4	3	28	3	28	1	38,7	51	21	3	A	4,7
H4	4	3	15	3	19	1	38,9	62	18	3	A	1,5
H5	4	2,5	9	3	17	1	38,5	48	16	2	A	4,3
Metritis	4(4-5)	2,75(2,375-3)	14(6,5-17,5)	3(2-4)	7(5,5-14)	1(1-3)	38,8(38,3-39,45)	64(60-78)	44(36-59,5)	2(1-2)	-	36,8(21-78,3)
Sanas	4(4-4,5)	3(2,75-3)	11(9-21,5)	3(3-3,5)	19(17-24,5)	1(1-1)	38,7(38,45-38,9)	51(48-58,5)	21(17-24)	3(2,5-3)	-	2,3(1,65-4,5)
P (M vs H)	0,544	0,367	0,674	0,694	0,005	0,207	0,537	0,028	0,001	0,005	-	0,019

Resultados principales

En cuanto a los cambios proteómicos, de las 181 proteínas identificadas en saliva con al menos dos péptidos únicos y 1% FDR, 15 se encontraron en distinta proporción entre los grupos sanos y metritis. Como puede observarse en la **Tabla 5**, ocho proteínas se encontraron en mayor concentración en las muestras salivares de vacas con metritis, mientras que siete proteínas se observaron en mayor concentración en las muestras provenientes de los animales sanos.

El análisis de la ontología genética (Gene Ontology, GO terms) mostraron seis términos sobre expresados en vacas con metritis con respecto a los animales sanos: regulación de procesos biológicos, actividad catalítica sobre proteínas, regulación de la proliferación de células epiteliales, transporte, periferia celular y unión a GDP.

Tabla 5: Proteínas con cambios significativos en saliva entre vacas sanas y con metritis.

	FC	log2(FC)	P valor	Regulación (metritis)
Transportador intracelular de colesterol NPC 2	2,191	1,132	0,059	AUMENTADA
Proteína S100A8	2,167	1,116	0,057	AUMENTADA
Inhibidor de disociación de GDP 2	2,164	1,114	0,035	AUMENTADA
Glicoproteína ácida alfa-1	2,123	1,086	0,095	AUMENTADA
Histona H4	1,938	0,954	0,063	AUMENTADA
Factor B del complemento	1,937	0,953	0,047	AUMENTADA
Quinasa de nucleósido difosfato B	1,827	0,869	0,048	AUMENTADA
Serpina B5	1,68	0,748	0,099	AUMENTADA
Regulador del canal de cloruro activado por calcio 1	0,63	-0,666	0,0004	DISMINUIDA
Cistatina-C	0,622	-0,686	0,092	DISMINUIDA
Cadena polipeptídica 1 similar al mayor alérgeno I	0,574	-0,8	0,099	DISMINUIDA
Glicoproteína alfa-2-HS	0,567	-0,819	0,063	DISMINUIDA
Proteína de expresión en cáncer de mama y glándula salival (Fragmento)	0,546	-0,872	0,026	DISMINUIDA
Mucina 5B, oligomérica, formadora de moco/gel	0,479	-1,063	0,015	DISMINUIDA
Proteína S100A7	0,469	-1,091	0,014	DISMINUIDA

La representación gráfica de los resultados, mostrada como un diagrama de volcán (**Figura 7**), ilustra las proteínas reguladas positiva y negativamente en la saliva de vacas con metritis.

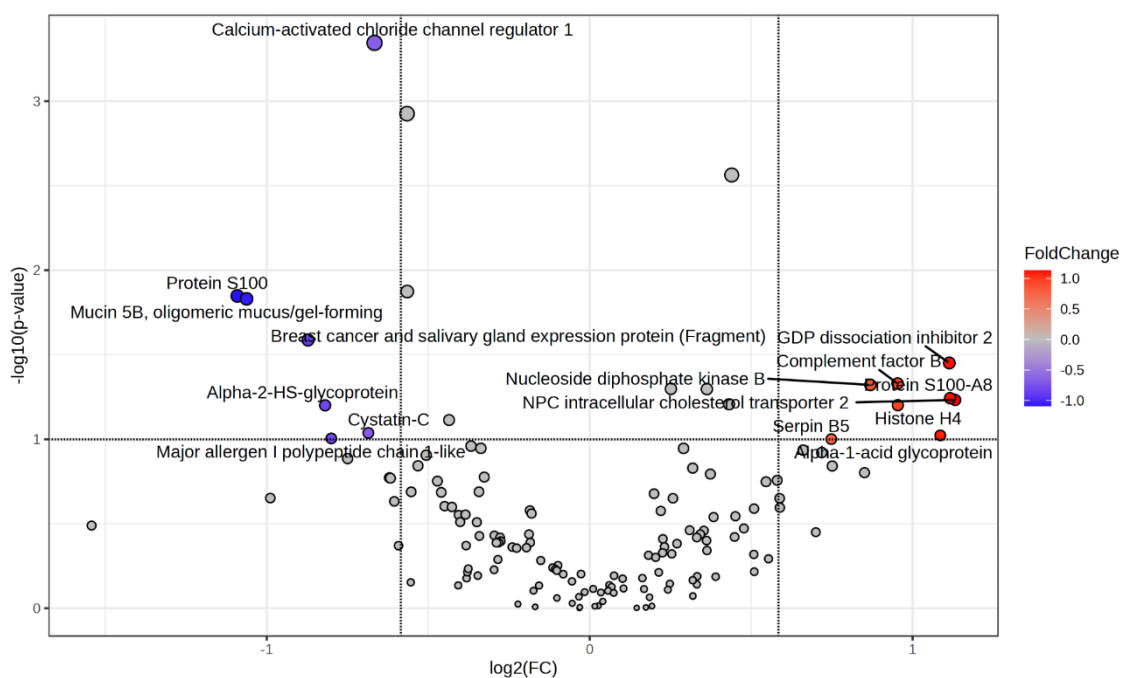


Figura 7: Gráfico de volcán que muestra las proteínas en saliva con mayor (color rojo) y menor (color azul) abundancia relativa entre los controles ($N=5$) y las vacas con metritis ($N=5$). Un valor positivo de Log2 (FC) indica un aumento de la expresión en metritis, mientras que un valor negativo indica una subexpresión en metritis.

En suero, el análisis proteómico permitió la identificación de 155 proteínas con al menos dos péptidos únicos y 1% FDR, de las cuales 22 estaban expresadas en diferente magnitud entre vacas sanas y vacas con metritis. Como puede observarse en la **Tabla 6**, diez proteínas se encontraron en mayor concentración en los sueros de vacas con metritis, mientras que doce proteínas se observaron en mayor concentración en las muestras provenientes de los animales sanos.

Tabla 6: Proteínas con cambios significativos en suero entre vacas sanas y con metritis.

	FC	log2(FC)	P-valor	Regulación (metritis)
<i>Haptoglobina</i>	4,1	2,03	0,012	AUMENTADA
<i>Glicoproteína ácida alfa-1</i>	3,17	1,67	0,004	AUMENTADA
<i>Glutación peroxidasa 3</i>	2,23	1,16	0,029	AUMENTADA
<i>Región variable de la cadena lambda de Ig (Fragmento)</i>	1,89	0,92	0,082	AUMENTADA
<i>Endopina 2B</i>	1,76	0,82	0,082	AUMENTADA
<i>Serpina A3-8</i>	1,73	0,79	0,074	AUMENTADA
<i>Fetuína-B</i>	1,7	0,76	0,091	AUMENTADA
<i>Serpina A3-1</i>	1,67	0,74	0,012	AUMENTADA
<i>Proteína de unión a lipopolisacáridos</i>	1,63	0,71	0,019	AUMENTADA
<i>Hemopexina</i>	1,55	0,63	0,097	AUMENTADA
<i>Beta-2-glicoproteína 1</i>	0,64	-0,65	0,094	DISMINUIDA
<i>Proteína SERPIND1</i>	0,64	-0,65	0,093	DISMINUIDA
<i>Transtiretina</i>	0,59	-0,76	0,083	DISMINUIDA
<i>Apolipoproteína C-IV</i>	0,56	-0,83	0,053	DISMINUIDA
<i>Oxidasa de aminas primarias, isoforma hepática</i>	0,55	-0,87	0,065	DISMINUIDA

El análisis de la ontología genética (Gene Ontology, GO terms) mostró 22 términos que cambiaron significativamente entre los grupos. Los términos GO que aumentan en enfermos fueron, ordenados por orden de magnitud: regulación del proceso metabólico, producción de interleucina-8, regulación de la producción de interleucina-8, respuesta al lípido, partícula de lipoproteína de alta densidad, gránulo cromafín, actividad de transportador transmembrana, proceso metabólico de lipoproteínas, regulación positiva de la actividad de la lipoproteína lipasa, proceso metabólico de triglicéridos. Mientras que los términos GO que se encontraron infrarrepresentados en enfermos fueron: localización de lípidos, homeostasis de lípidos, partícula de lipoproteína de muy

baja densidad, homeostasis del colesterol, partícula de lipoproteína de alta densidad, quilomicrón.

La representación gráfica de los resultados, mostrada como un diagrama de volcán (**Figura 8**), ilustra las proteínas reguladas positiva y negativamente en el suero de vacas sanas y con metritis.

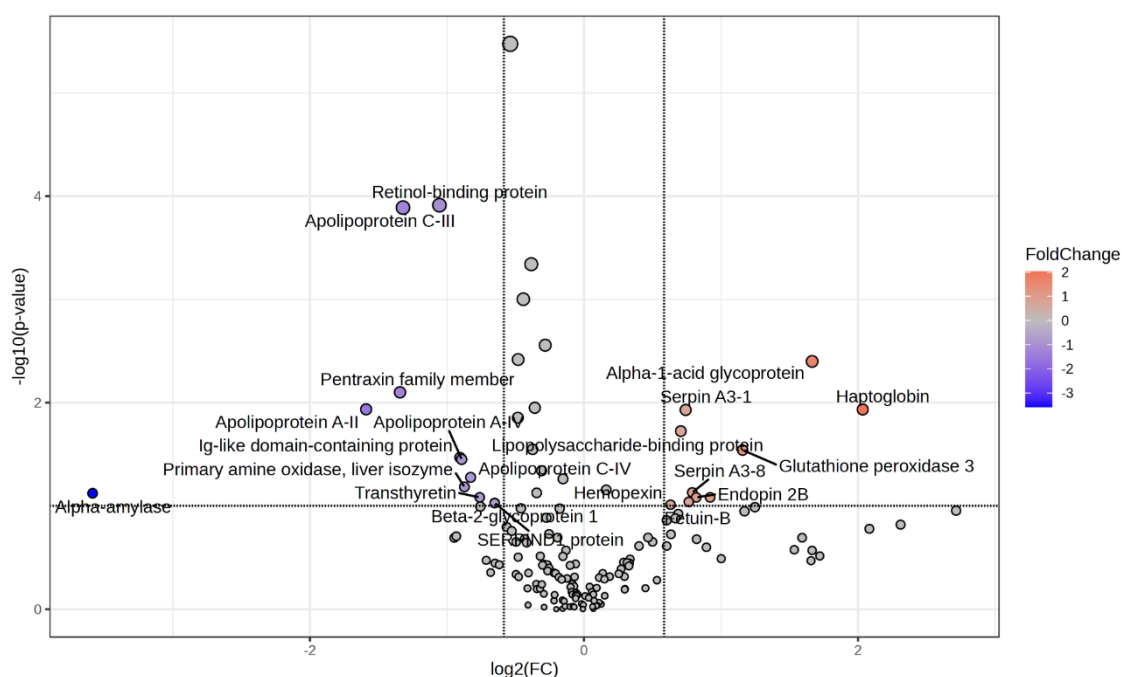


Figura 8: Gráfico de volcán que muestra las proteínas séricas con mayor (color rojo) y menor (color azul) abundancia relativa entre los controles (N=5) y las vacas con metritis (N=5). Un valor positivo de Log2 (FC) indica un aumento de la expresión en metritis, mientras que un valor negativo indica una subexpresión en metritis.

En cuanto a la validación de la calprotectina como posible biomarcador en saliva que permita distinguir entre vacas sanas y con metritis, en primer lugar, se realizó una validación analítica, como se describe en el apartado **4.4.1. Validación analítica**. Los CV intraensayo fueron de 0% y 2,36%, el coeficiente de linealidad R^2 fue de 0,994, y el límite bajo de detección se estableció en 0.1 mg/mL.

Se observaron niveles de calprotectina significativamente mayores en vacas con metritis (0,44 (0,41-0,5) mg/L) en comparación a los animales sanos (0,17 (0,1-0,26) mg/L) ($P<0,001$), tal y cómo se muestra en la **Figura 9**.

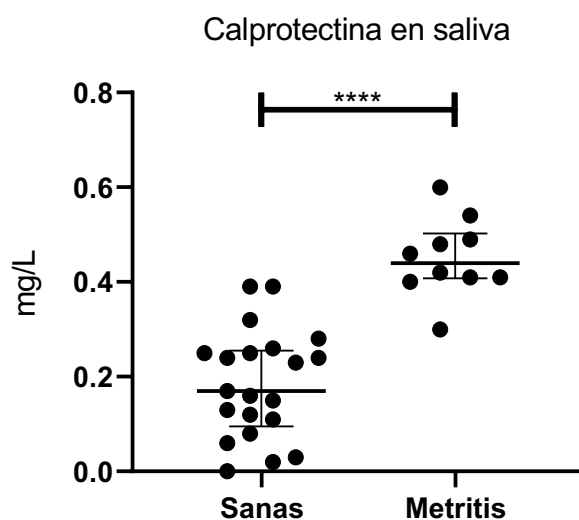


Figura 9: Calprotectina en saliva de vacas sanas ($n=23$) y vacas con metritis ($n=14$).
****: $P<0,001$.

A pesar de que este estudio sobrepasa el mínimo de tres animales por grupo para los estudios proteómicos (Westermeyer, Naven and Höpker, 2008), el empleo de únicamente cinco animales por grupo podría considerarse como una de las principales limitaciones del estudio. En segundo lugar, solo se incluyeron vacas lecheras de una raza y granja en particular, por lo que la posible influencia de factores como el estado energético o los diferentes patrones de manejo podrían dar lugar a resultados diferentes. Por tanto, sería recomendable realizar más estudios con poblaciones más grandes y heterogéneas, con el objetivo de confirmar o refutar los resultados de este capítulo.

8. DISCUSIÓN GENERAL

A pesar de los numerosos estudios y guías que se han elaborado con el paso de los años para el diagnóstico de la metritis, aún existen varios retos. Uno de ellos es la variabilidad en la presentación clínica de la enfermedad, lo que ha llevado a una falta de consenso en su diagnóstico (Garzon *et al.*, 2022). Además, el estudio de únicamente los signos clínicos también impide detectar las metritis subclínicas. Esta dificultad en el diagnóstico de la metritis puede llevar a diagnósticos erróneos, lo que se traduce en un aumento en el uso de antibióticos innecesario. De hecho, en el ganado vacuno, únicamente detrás de la mastitis, la metritis es la segunda enfermedad en la que se usan más antibióticos (USDA-APHIS-VS-CEAH-NAHMS, 2021), promoviendo el problema global actual de la resistencia antimicrobiana (Garzon *et al.*, 2022).

Para el diagnóstico de la metritis, los signos clínicos durante las exploraciones físicas como el grado de depresión, temperatura, frecuencia cardíaca y respiratoria, motilidad ruminal, producción láctea o la presencia y características del flujo vaginal son de gran importancia ya que son los primeros indicadores para los veterinarios para sospechar de metritis en el puerperio. Es por ello por lo que, en esta tesis doctoral, se recogió información clínica de todos los animales antes de su muestreo. Esta información se utilizó para comparar el estado de los animales incluidos en la tesis con la literatura previa, para hacer una comparación entre animales sanos y con metritis, y para descartar posibles signos de enfermedad en los animales considerados como sanos y usados como grupo control.

En concreto, en el Capítulo 2, tal y como se muestra en la **Tabla 2**, las vacas con metritis mostraron mayores niveles de depresión, frecuencia cardíaca y respiratoria y motilidad ruminal (1,5; 1,2; 1,8; y 1 vez mayor, respectivamente) en comparación al grupo control, así como una menor producción lechera (0,7 veces). Sin embargo, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la temperatura rectal entre los dos grupos, que se ha considerado clásicamente como un síntoma común en metritis (Garzon *et al.*, 2022). De manera similar a nuestros resultados, otros estudios reportan que hasta un 50-80% de las vacas con metritis no presentan fiebre, considerándola como temperatura mayor a 39,5°C (Barragan *et al.*, 2018; Mikulková *et al.*, 2020). La menor

producción lechera observada en las vacas con metritis con respecto al grupo control también ha sido descrita con anterioridad (Sheldon *et al.*, 2006; Dervishi *et al.*, 2016; Mikulková *et al.*, 2020; Malledevarahalli Chandrappa *et al.*, 2023). Por lo tanto, los cambios observados en los parámetros descriptivos fueron compatibles con la presencia de metritis.

En el Capítulo 3, para la selección de los animales a partir de los muestreados durante el Capítulo 2, se tuvo en cuenta que no hubiera diferencias significativas entre los grupos en términos de edad, BCS, días en leche y número de lactación. Además, todas las vacas consideradas con metritis presentaron una descarga vaginal de olor pútrido, mientras que los animales sanos no mostraron descarga vaginal anormal. Una vez seleccionados los cinco animales de cada grupo atendiendo a estos criterios y al volumen de muestra disponible para realizar los análisis proteómicos, se analizaron las posibles diferencias en producción láctea, grado de depresión, temperatura rectal, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria y motilidad ruminal. Además, se comprobó si había diferencias en los valores de la proteína de fase aguda mayor SAA, que fue medida durante el Capítulo 2. Tal y cómo se puede observar en la **Tabla 4**, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los animales de los dos grupos en producción lechera, frecuencias respiratoria y cardíaca, motilidad ruminal y SAA.

Hay diversos estudios anteriores que muestran cambios en el perfil bioquímico sanguíneo en vacas con metritis (Dervishi *et al.*, 2016; Paiano *et al.*, 2021). Es por ello por lo que esta tesis doctoral se enfoca en evaluar el potencial de los análisis clínicos analíticos para el diagnóstico de metritis, presentando como novedad el uso de la saliva.

Importancia de controlar y tener en cuenta el grado de suciedad y contaminación de la saliva

La saliva es hoy en día un fluido diagnóstico que presenta un interés creciente para evaluar y monitorizar diversas situaciones que afectan a la salud y bienestar de numerosas especies animales, incluyendo la humana, tal y como se representa en la **Figura 10**. (García Pinillos *et al.*, 2016; Franco-Martínez and Castillo-Felipe, 2020). Esto se debe a que es un tipo de muestra que puede obtenerse de manera muy conveniente, ya que su recolección es tan sencilla que no requiere personal especializado (Lamy and Mau, 2012), requiere materiales económicos y de fácil acceso, y tiene un procesamiento sencillo en el laboratorio. Pero, sobre todo, su mayor ventaja radica en ser una muestra considerada mínimamente invasiva que suele ser muy bien tolerada por el animal, no resultando ni estresante ni doloroso (Burnett *et al.*, 2014; Franco-Martínez and Castillo-Felipe, 2020).

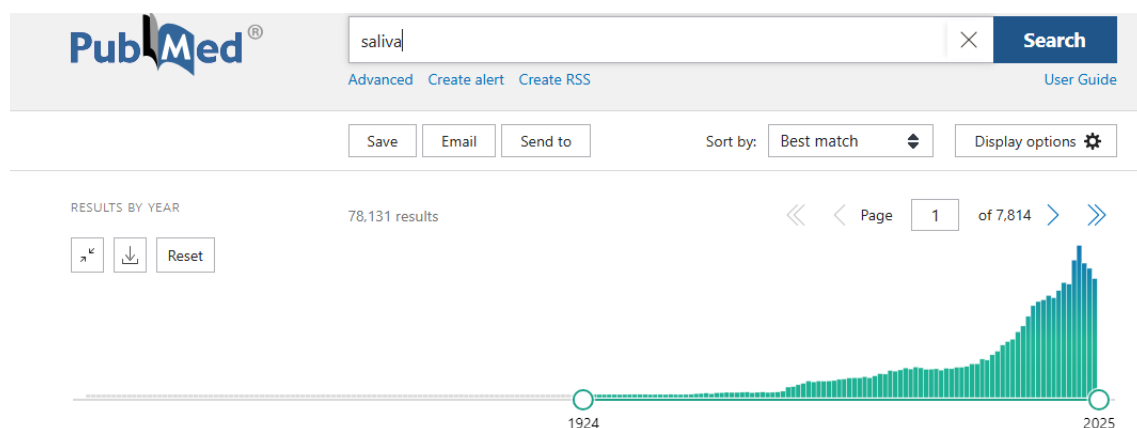


Figura 10: Número de entradas para el término “saliva” en PubMed, apreciándose un incremento progresivo en el número de resultados con el paso de los años.

En vacuno, existen estudios previos que han medido un perfil bioquímico completo en saliva, similar al que se mediría en suero o plasma, llamado sialoquímica (*sialochemistry* en inglés). En concreto, se han observado diferencias en este perfil entre animales sanos y vacas con mastitis, laminitis, o durante el parto (Contreras-Aguilar *et al.*, 2019; Contreras-Aguilar, Vallejo-Mateo, *et al.*, 2020; Contreras-Aguilar *et al.*, 2021). Sin embargo, y a pesar de la importancia de la enfermedad y del potencial de la saliva, hasta la fecha estos estudios no se han llevado a cabo en vacas con metritis.

Sin embargo, antes de analizar la posible utilidad de la saliva para el diagnóstico de la metritis en el ganado vacuno, resulta de suma importancia evaluar si pueden existir algunos factores ajenos a la enfermedad que puedan alterar nuestros resultados y llevarnos a conclusiones erróneas. Por ejemplo, muchos de los analitos que se miden en un perfil rutinario sérico, y que serán por tanto evaluados en saliva en esta tesis doctoral, son medidos mediante técnicas espectrofotométricas o colorimétricas. De manera general, las técnicas espectrofotométricas o colorimétricas se basan en los cambios de color de la muestra ocasionados al ocurrir una reacción tras la adición de un reactivo determinado. El uso de estas técnicas colorimétricas tiene, de manera general, una serie de ventajas de gran relevancia que las hace muy adecuadas para este tipo de análisis, como la sencillez de uso y que suelen darse de manera similar entre distintas especies y biofluidos, además de ser económicas y automatizables (Franco-Martínez, Martínez-Subiela, *et al.*, 2020).

Sin embargo, una muestra que tenga un color distinto al original podría dar lugar a un resultado erróneo. Estos cambios de color raramente ocurren en otro tipo de muestras como las séricas, pero pueden ser frecuentes en la saliva de animales, ocasionadas principalmente por la presencia de comida en la cavidad oral en el momento del muestreo. Además, se sabe que la presencia de alimento en las muestras de saliva puede interferir también en la cuantificación analítica en ciertos casos. Por ejemplo, se ha descrito que en personas la actividad de la sAA puede aumentar en presencia de alimentos con un contenido alto en carbohidratos (Strahler *et al.*, 2017). De manera similar, se ha demostrado que la presencia de alimento en la saliva puede afectar a un panel de biomarcadores salivales en caballos (Contreras-Aguilar, Hevia, *et al.*, 2020). Es por ello

que, en estudios con humanos, se recomienda tomar las muestras de saliva después de enjuagar la boca para minimizar las posibles interferencias causadas por restos de alimentos (DeCaro, 2008; Sondej *et al.*, 2009). De modo similar, en caballos, también se recomienda emplear salivas limpias para el estudio de biomarcadores (Contreras-Aguilar, Hevia, *et al.*, 2020). Sin embargo, esto no se ha evaluado hasta la fecha en el ganado vacuno.

Es por ello por lo que el **Capítulo 1** de la presente tesis doctoral se centró en el estudio de las posibles interferencias en los analitos medidos en saliva que pudieran causar los restos de comida. Para ello, se evaluaron *in vitro* los potenciales efectos de la presencia de diferentes tipos de comida en algunos biomarcadores previamente validados [10] en muestras salivales. En este estudio se mostró un CV mayor de un 15% para la mayoría de los alimentos, así como cambios con respecto a la muestra limpia. Otros marcadores como cortisol o gGT no se alteraron significativamente entre los diferentes tratamientos. Por tanto, se puede determinar que los resultados de la mayoría de los analitos evaluados se ven afectados significativamente por la presencia de alimento en las muestras salivares de vacas. Este hecho es de gran importancia, ya que, si las muestras se encuentran contaminadas con alimento, podría realizarse una interpretación de los resultados errónea.

Estos cambios pudieron deberse a varias causas. Una podría ser la composición del alimento probado. Por ejemplo, el brócoli presente en la premezcla, el heno de trigo y el pasto han demostrado tener *per se* capacidad antioxidante (Leja *et al.*, 2001; Arora, Sharma and Chandra, 2011; Esfandi, Walters and Tsopmo, 2019); y su contenido en glucosa, grasas y minerales, entre otros componentes, pueden causar varias interferencias en los ensayos analíticos medidos al igual que se ha observado en humana (Nunes and Macedo, 2013). Una segunda razón podría ser el cambio de color/turbidez cuando está presente el alimento, como se observa en la **Figura 5**, ya que también puede interferir con las mediciones analíticas, especialmente en aquellas basadas en métodos espectrofotométricos/colorimétricos (Franco-Martínez, Rubio and Contreras-Aguilar, 2020).

Además, algunos de los cambios en ciertos analitos, como AOPP, ALP, triglicéridos y calcio total en la saliva control C2 pudiera deberse al efecto de la incubación a 38°C. Por ejemplo, las concentraciones de calcio total in la alícuota de saliva limpia calentada (C2) fueron mucho menores (media de concentración = $0,08 \pm 0.01$ mmol/L) que en la alícuota de saliva control limpia (C1, media de concentración = $0,33 \pm 0.08$ mmol/L). Se lanza como hipótesis la posibilidad de que los componentes de la saliva y enzimas (ejemplo, la sAA) pueden usar el calcio inicial presente en la saliva para sus actividades tras ser activadas por la temperatura (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020), reduciendo la concentración de calcio disponible en la muestra. Sin embargo, posteriores investigaciones deberían evaluar los mecanismos por los que se pueden producir estas variaciones analíticas in la saliva de vaca.

Por otro lado, los cambios observados en el estudio de este capítulo debido a la presencia de los alimentos evaluados (todos o algunos) en la saliva de las vacas pudieran afectar a la interpretación clínica de los analitos medidos cuando se evalúen en condiciones estresantes/patológicas, como es el caso de la Lip, biomarcadores de estrés oxidativo, AST, triglicéridos, glucosa o lactato, ya que estas variaciones en los analitos señalados son cercanas al 100% comparado con la saliva limpia original. Sin embargo, hay otros analitos salivales que también muestran cambios significativos en la saliva incubada con los alimentos estudiados, pero que no reflejarían cambios con significancia clínica relevante. Es decir, en el caso del ADA en la saliva con la premezcla, su actividad incrementó de 2,2 UI/L a 4,2 UI/L; sin embargo, se sabe que los valores medios ascienden hasta los 22,4 IU/L en procesos inflamatorios o estresantes como el parto comparado con los valores medios de 6,1 UI/L antes del parto (Contreras-Aguilar, Tvarijonaviciute, *et al.*, 2020). Además, hubo analitos que no mostraron cambios significativos y/o con variaciones tolerados como aceptables (con CV menores del 15%) cuando algunos de los alimentos evaluados fueron añadidos a la saliva limpia. Este es el caso del cortisol, ALP, gGT, fósforo, ADA en presencia de heno de trigo y/o pasto, CK en la premezcla o lactato en el pasto. Por tanto, según este estudio, estos analitos no se verían afectados en la saliva de vacas en presencia de estos alimentos testados. Esto sería relevante ya que se han propuesto en el ganado vacuno de leche el ADA, gGT y lactato como biomarcadores inflamatorios, y CK como biomarcador relacionado con la producción láctea (Contreras-

Aguilar *et al.*, 2019, 2021; Franco-Martínez *et al.*, 2021). Sin embargo, la interpretación de estos resultados no deberían ser extrapolados a otras especies ya que algunos de estos analitos, como la gGT o el fósforo, sí que cambiaron de forma diferentes cuando un estudio experimental similar se llevó a cabo en el caballo (Contreras-Aguilar, Hevia, *et al.*, 2020).

Por tanto, sería recomendable tener en cuenta una serie de consideraciones a la hora de muestrear saliva en vacas, con el objetivo de reducir estos factores lo máximo posible. Una de las medidas más efectivas es el lavado de boca del animal con agua (**Figura 11**: Ejemplo de procedimiento de lavado de boca en una vaca), pudiéndose usar para ello una jeringa grande o un dispositivo para la alimentación de terneros, de modo similar al descrito previamente para caballos (Contreras-Aguilar, Hevia, *et al.*, 2020). Tras el lavado de boca, debe esperarse al menos dos minutos antes de muestrear, para evitar que la saliva se diluya con el agua utilizada en el lavado.



Figura 11: Ejemplo de procedimiento de lavado de boca en una vaca

En el caso de que el lavado de boca no sea posible, puede realizarse una serie de medidas de manejo que promueva la obtención de una muestra salivar limpia, como muestrear durante el ordeño o mantener a las vacas con el cabezal de sujeción cerrado

antes de ofrecer el alimento. Sin embargo, esta última alternativa podría estimular la producción de saliva debido a los impulsos neuronales si el momento de la alimentación está próximo, lo que, por lo tanto, podría generar cambios en la concentración o actividad de los analitos salivales medidos; un efecto que deberá evaluarse en el futuro.

A partir de los resultados de este estudio, se llevaron a cabo las medidas recogidas en el párrafo anterior, con el objetivo de obtener muestras salivares lo más limpias y transparentes posibles. De ese modo, podemos descartar la presencia de restos de alimento o cambios en el color de la muestra como factores que nos pudieran influir en los estudios futuros.

Sialoquímica

Una vez demostrado que la saliva del vacuno de leche permite la cuantificación de una amplia batería de marcadores de salud y bienestar, el siguiente objetivo fue evaluar si se observaban cambios en estos analitos en saliva entre vacas sanas y con metritis. Para ello, en el **Capítulo 2** se seleccionaron una serie de analitos que podían ser medidos de manera sencilla, rápida, económica y, en la todos los casos excepto para cortisol y haptoglobina en saliva, automática. En conjunto, estos marcadores evalúan diferentes vías fisiológicas como estrés, inmunidad, inflamación y estado redox (Contreras-Aguilar *et al.*, 2019; Contreras-Aguilar, Vallejo-Mateo, *et al.*, 2020; Contreras-Aguilar *et al.*, 2021), para poder obtener una visión general de las alteraciones del estado de salud de los animales con metritis en el momento de su diagnóstico. Algunos biomarcadores han sido medidos solo en un biofluido, por causas variadas. Por ejemplo, la butirilcolinesterasa se ha medido únicamente en saliva porque estudios previos han demostrado que su actividad en suero es muy baja (Tecles and Cerón, 2001).

Para ello, el primer paso consistió en la validación analítica de todos los analitos que no habían sido validados previamente en saliva o suero en el ganado vacuno, siguiendo el protocolo descrito en el apartado **4.4.1 Validación analítica** de la presente tesis doctoral. En todos los casos, los datos que documentan la precisión y exactitud para saliva y suero fueron adecuados, estando dentro de los límites del rango de aceptación

según la Guía para la Industria (Food and Drug Administration *et al.*, 2013), tal y como se muestra en la **Tabla 3**.

Basándonos en los resultados del Capítulo 2, la metritis en vacas no produce cambios significativos en el hemograma, salvo una reducción en el recuento de eosinófilos (0,7-fold). Sin embargo, es importante destacar que, aunque no fue estadísticamente significativa, también se observó una tendencia a tener un número menor de linfocitos (0,9-fold) (Barragan *et al.*, 2018; Mikulková *et al.*, 2020). En conjunto, la presencia de eosinopenia y leucopenia podrían ser compatibles con un leucograma de estrés.

Este hallazgo sería compatible con el aumento de lipasa en saliva, un marcador de estrés, observado en las vacas con metritis, y que ha sido descrito previamente en laminitis (Contreras-Aguilar, Vallejo-Mateo, *et al.*, 2020) y en relación al parto (Contreras-Aguilar *et al.*, 2021). En el caso de la alfa amilasa salivar, ésta se vio incrementada en dos magnitudes en las vacas con metritis, aunque no fue estadísticamente significativo. No se encontraron diferencias en los valores de cortisol entre los dos grupos, al igual que en estudios anteriores (Kaczmarowski, Malinowski and Markiewicz, 2006; Barragan *et al.*, 2018). Por lo tanto, los resultados sugieren que las vacas con metritis podrían tener niveles de estrés mayores que las vacas control, probablemente como producto del proceso inflamatorio y la incomodidad producida durante la enfermedad. Este proceso inflamatorio fue evidenciado por el aumento de todos los marcadores inflamatorios evaluados (Hp, SAA, fibrinógeno, y ferritina). En nuestro estudio, se midieron las cuatro APPs en suero, y haptoglobina también fue medida en saliva, ya que por el momento no existen métodos para evaluar SAA, fibrinógeno y ferritina en saliva. Estos biomarcadores son proteínas de fase aguda (*acute phase proteins*, APPs), que se caracterizan por ser muy sensibles a la inflamación y por cambiar muy rápidamente tras un daño tisular. En vacas, Hp y SAA se consideran APPs mayores, mostrando cambios de gran magnitud ante inflamación, mientras que fibrinógeno y ferritina se consideran moderadas o menores, con cambios de magnitud menores (Ceciliani *et al.*, 2012). Esto se evidenció en nuestro estudio, ya que los mayores cambios en suero fueron en SAA (18,3 veces) y Hp, mostrando tanto el fibrinógeno (3,6) y la ferritina (1,7) aumentos más

comedidos. En el caso de la haptoglobina, en suero, todos los animales sanos y un 25% de las vacas con metritis tenían valores por debajo del límite bajo de cuantificación (LLOQ) del ensayo, en concordancia con estudios previos usando plasma en el que solo los animales más afectados muestran aumentos altos de Hp (J. Hirvonen, G. Huszenicza, M. Kulcsár, 1997). Sin embargo, en saliva, todas las vacas con metritis y un 43% de las sanas tuvieron valores de Hp mayores al LLOQ, siendo la mediana en el grupo metritis 6,3 veces mayor que en las sanas. Por lo tanto, podría considerarse que, al menos en el caso de la Hp, la saliva sería un biofluido más sensible que el suero para detectar la inflamación en animales con metritis.

Como biomarcador de activación del sistema inmune e inmunidad celular se midió ADA (Fontes Baganha *et al.*, 1990). Además, se ha propuesto ADA como marcador proinflamatorio en especies domésticas, encontrándose elevado en vacas tras el parto (Alexandro Fritzen, Kassio D. Albani, Gustavo Machado, Nathieli B. Bottari, Mariana S. Alves, Maria Rosa C. Schetinger, Vera M. Morsch, Jessica Giuriatti, 2016). De manera similar a lo reportado ante otras condiciones inflamatorias (Contreras-Aguilar, Tvarijonaviciute, *et al.*, 2020), en este estudio se encontraron aumentos mayores en saliva (1,8 veces) que en suero (1,4 veces) en las vacas con metritis, con respecto al grupo control.

En nuestro estudio, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los biomarcadores de estrés oxidativo. Sin embargo, la literatura sí ha descrito diferencias en otros marcadores redox como metabolitos reactivos del oxígeno (d-ROMs), antioxidantes (OXYs) y del índice de estado oxidativo (OSI) en el plasma de vacas con metritis (Malledevarahalli Chandrappa *et al.*, 2023), así como niveles más altos de malondialdehído y menores concentraciones de vitaminas A y E en el suero de vacas con metritis (Mikulková *et al.*, 2020). Estas discrepancias en los resultados pueden darse por diversos factores, incluyendo diferencias en la severidad de la metritis, el tamaño de muestra, o el uso de diferentes biofluidos o biomarcadores, que reflejan procesos del balance redox diferentes.

Finalmente, también se encontraron diferencias en los biomarcadores de metabolismo general, así como de daño muscular, hepático o renal entre las vacas sanas

y con metritis. En concreto, cinco biomarcadores en saliva se encontraron aumentados en vacas con metritis: proteínas (1,3 veces), gGT (2,5 veces), AST (3,7 veces), ALP (5,1 veces) y CK (2.01 veces). En suero, dos marcadores aumentaron (NEFAs (2.2 veces) y bilirrubina (1,6 veces)) y cinco (albúmina (0,8 veces), urea (0,6 veces), lactato (0,9 veces), fósforo (0,9 veces) y calcio (0,9 veces)) mostraron niveles disminuidos en comparación con los controles. Estos resultados concuerdan con la literatura previa, que reporta niveles más bajos de albúmina, urea y calcio en el suero de vacas con metritis, así como mayores concentraciones de NEFAs (Herdt, 2000; Mikulková *et al.*, 2020) y bilirrubina (Hammon *et al.*, 2006; Barragan *et al.*, 2018; Mikulková *et al.*, 2020; Dervishi *et al.*, 2021; Paiano *et al.*, 2021). Parte de estos cambios podrían deberse a la ingesta insuficiente de energía durante el período periparto, que promueve la lipomovilización y el aumento de los NEFAs (Omur *et al.*, 2016; Mikulková *et al.*, 2020), así como daño hepático (Park *et al.*, 2002; Omur *et al.*, 2016; Mikulková *et al.*, 2020), lo cual se refleja en el incremento de bilirrubina, gGT, AST y ALP observado en nuestro estudio en saliva y, en el caso del suero, en la bilirrubina. En las vacas con metritis, esta ingesta reducida podría ser más marcada (Rial *et al.*, 2023), promoviendo estos cambios con respecto al grupo control. Además, se ha informado que la hipocalcemia en el suero incrementa la incidencia de enfermedades infecciosas como la metritis (Ingvarsen and Moyes, 2013; Martinez *et al.*, 2014; Mikulková *et al.*, 2020).

A pesar de que en nuestro estudio no había diferencias estadísticamente significativas en la BCS entre los dos grupos de animales, se incluyó esta variable en el análisis ANOVA, con el objetivo de evaluar si BCS pudiera afectar los resultados obtenidos. De manera similar, se evaluó la interacción BCS-Grupo (sanos *versus* enfermos) para evaluar si la condición corporal podía afectar de manera distinta a los valores de los biomarcadores entre animales sanos y con metritis. En saliva, se vieron que tanto el ácido úrico como las proteínas totales eran más altos en vacas con mayor BCS, siendo dos biomarcadores que se ven afectados por la toma de alimento. El análisis en suero mostró que únicamente la haptoglobina se veía afectada por la condición corporal, mostrando menores valores en vacas con mayores BCS. Una Hp baja indica que no hay una gran activación del sistema inmune y, por lo tanto, el animal tendría más recursos energéticos para emplear en aumentar su condición corporal. Sin embargo, futuros

estudios serían necesarios para confirmar o descartar esta hipótesis. Por lo tanto, sería recomendable tener en cuenta esta posible influencia de la BCS a la hora de interpretar los resultados de ciertos biomarcadores. Aunque, en cualquier caso, al no haber diferencias significativas entre el BCS entre animales sanos y con metritis en nuestro estudio, puede descartarse que este factor haya podido influir en los resultados y conclusiones expuestos aquí.

Finalmente, en este capítulo se evaluó la relación de los resultados obtenidos entre saliva y suero. En primer lugar, se calculó el grado de correlación de todos los analitos que fueron medidos tanto en saliva como en suero. Únicamente la urea mostró una correlación positiva fuerte ($R^2 > 0,7$) entre los dos biofluidos. Esta correlación también ha sido descrita previamente en perros y en humanos, y cree que la urea puede entrar a la saliva por difusión pasiva por los acinos de las glándulas salivares desde la sangre (Fontes Baganha *et al.*, 1990; Alexandro Fritzen, Kassio D. Albani, Gustavo Machado, Nathieli B. Bottari, Mariana S. Alves, Maria Rosa C. Schetinger, Vera M. Morsch, Jessica Giuriatti, 2016). También se encontraron correlaciones estadísticamente significativas para Hp, FRAP, CUPRAC, AOPPs (AOPPs en saliva y comparado con la ratio AOPPs/albúmina en suero), y fósforo, aunque fueron débiles en todos los casos, con R^2 de 0,28 a 0,397.

Además, cuando se compararon los cambios de magnitud de cada biomarcador entre los dos fluidos, se generaron varias hipótesis. La saliva pareció tener una mayor sensibilidad para detectar cambios en los marcadores hepáticos (como proteínas, gGT, AST, y ALP), así como para ADA and Hp. Por el contrario, los cambios en urea, lactato, fósforo y calcio solo fueron significativos en el caso del suero. Por lo tanto, los resultados de un biofluido no son extrapolables al otro. Otros artículos han descrito previamente este hecho en vacas, describiendo diferencias entre los biomarcadores de ambos fluidos (Contreras-Aguilar *et al.*, 2019). Por lo tanto, puede concluirse que, basándonos en nuestros resultados y en literatura previa, la saliva aporta información diferente a la que se observa en el suero, y viceversa, por lo que ambos biofluidos tienen potencial para el diagnóstico de la metritis en vacas lecheras, ofreciendo información complementaria.

Por lo tanto, a partir de los resultados obtenidos del capítulo 2, podemos concluir que la metritis en vacas se asocia, además de con cambios en parámetros descriptivos, con diversos cambios en la bioquímica sérica y salivar. Ambos biofluidos fueron capaces de identificar cambios en marcadores de estrés, inflamación, activación del sistema inmune y metabolismo general. Así, los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que la saliva tiene utilidad en el diagnóstico de la metritis en el ganado vacuno, mediante la medición de un perfil sialoquímico.

Análisis proteómicos

Por tanto, tal y como se ha observado en el capítulo anterior, los análisis clínicos de rutina en saliva o sialoquímica tienen el potencial de detectar cambios en diversos procesos biológicos en vacas con metritis, en comparación a los resultados en vacas control.

En el **Capítulo 3**, se pretende dar un paso más allá y explorar si el uso de técnicas analíticas avanzadas como es el uso de la proteómica líquida en saliva podría aportar más información sobre la fisiopatología de la enfermedad e identificar posibles nuevos biomarcadores para su diagnóstico. Estos estudios proteómicos ofrecen la posibilidad de identificar todas las proteínas presentes en la muestra, y comparar su concentración entre los diferentes grupos, aportando por lo tanto información semicuantitativa. Por lo tanto, al identificar las proteínas cuya abundancia cambia entre el grupo control y el grupo de animales enfermos, pueden identificarse nuevos candidatos a biomarcadores de la enfermedad (Almeida *et al.*, 2015), que tendrán que ser evaluados en sucesivos estudios clínicos. Además, mediante la bioinformática pueden detectarse aquellas rutas fisiológicas alteradas durante la enfermedad, pudiendo identificarse posibles futuras dianas terapéuticas. Un estudio previo usando la misma metodología que la empleada en el capítulo 3 identificó cambios en más de sesenta proteínas en saliva entre vacas sanas y vacas con mastitis, demostrando el potencial de la saliva en este tipo de análisis (Franco-Martínez *et al.*, 2021). También hay descritos otros estudios proteómicos en vacas con estrés térmico, en relación con otros parámetros como fertilidad o parámetros de producción de leche, o incluso evaluando vesículas extracelulares de fluido uterino en

metritis. Sin embargo, en todos los casos los protocolos empleados fueron diferentes, y no evaluaban muestras pareadas de saliva y suero. Tras identificar las proteínas que cambian entre los grupos, el análisis de la Ontología Genética (GO) identifica los procesos biológicos, componentes celulares y funciones moleculares asociados con estas proteínas diferencialmente expresadas.

En este capítulo se evaluó el proteoma de saliva y suero en cinco animales sanos y cinco animales con metritis. Entre los dos grupos, no había diferencias estadísticamente significativas en edad, BCS, días en lactación, número de lactación, grado de depresión, o temperatura. Sin embargo, sí se encontraron mayores frecuencias respiratorias y cardíaca, concentración de amiloide A sérica, así como una menor producción láctea, en las vacas con metritis. Al comparar los proteomas entre los grupos se observaron una serie de cambios. En la saliva, se identificaron 181 proteínas, de las cuales quince cambiaban significativamente entre los grupos. Estas proteínas estaban relacionadas con la inflamación y la respuesta inmune (S100A8, S100A7, glicoproteína ácida alfa-1, factor B del complemento y serpin B5), el metabolismo y transporte de lípidos (transportador intracelular de colesterol NPC2 y glicoproteína alfa-2-HS), el estrés oxidativo y la reparación del ADN (histona H4 y quinasa de nucleósido difosfato B), la señalización celular (inhibidor de disociación de GDP 2) y proteínas con funciones estructurales y mucosas (mucina 5B, cistatina-C y regulador 1 de canales de cloruro activados por calcio). A continuación, se discuten algunos de los cambios de mayor relevancia para el objetivo de este estudio.

Los niveles más altos de transportador intracelular de colesterol NPC2 (*NPC intracellular cholesterol transporter 2*), y S100A8 (también conocida como calgranulina A, *calgranulin A*). NPC2 tiene un papel crucial en el transporte intracelular de colesterol no esterificado entre los lisosomas y otras organelas (Ko *et al.*, 2003) y, en humanos, sus niveles se correlacionan con la gravedad de la sepsis, asociándose concentraciones séricas más altas de NPC2 con la presentación de choques sépticos (Bai *et al.*, 2021).

El regulador 1 de canales de cloruro activados por calcio (*Calcium-activated chloride channel regulator 1*, CLCA1) fue la proteína que más disminuyó en la saliva de vacas con metritis. Está relacionada la regulación de mucinas y forma parte de la respuesta

inmune innata (Liu and Shi, 2019). Niveles bajos de CLCA1 están relacionados con niveles menores de mucina 5B que también se reduce en procesos inflamatorios (Grondin *et al.*, 2020) y en nuestro estudio presentó concentraciones más bajas en vacas con metritis. La glicoproteína alfa-2-HS, que es considerada como una proteína de fase aguda negativa debido a que presenta concentraciones menores durante la inflamación (Lebreton *et al.*, 1979), también se observó en menor abundancia en el grupo de metritis. Por lo tanto, los cambios observados en CLCA1, mucina 5B y glicoproteína alfa-2-HS sugieren la presencia de inflamación en las vacas de metritis, y la capacidad de la saliva en detectar estos cambios.

Los niveles de cistatina C (cystatin-C) en saliva de vacas con metritis fueron menores con respecto al grupo control. Sin embargo, está descrito que la cistatina C suele aumentar en sepsis (Llamas-Amor *et al.*, 2024). Una posible explicación sería que el aumento de filtración glomerular que se produce durante la metritis (Beunders *et al.*, 2020) promoviera un descenso en los niveles de cistatina C, como se ha descrito anteriormente (Kukla *et al.*, 2014).

Finalmente, se vieron cambios en la concentración de saliva entre los dos grupos en proteínas de la familia S100. Las proteínas de la familia S100 están relacionadas con la activación de la inflamación y del sistema inmune, viéndose generalmente aumentadas en sepsis (Cerón *et al.*, 2023). Sin embargo, en nuestro estudio, se observaron menores niveles de S100A7 en la saliva de vacas enfermas. Una hipótesis sería que los menores niveles de S100A7 observados sean reflejo de un mecanismo compensatorio, ya que la inhibición de S100A7 se ha visto que reduce la inflamación en el útero de las mujeres (Sun *et al.*, 2021).

En el caso de la proteína S100A8, se observaron mayores en vacas con metritis. Esta proteína al unirse a la S100A9 forma un heterodímero llamado calprotectina. En humanos, la calprotectina es la forma más común de S100A8 y S100A9 (Jukic *et al.*, 2021; Kim *et al.*, 2022), aunque en vacas este dato se desconoce. En humanos, la calprotectina se mide en heces para detectar la enfermedad inflamatoria intestinal, y en suero se emplea como biomarcador de sepsis. En cerdos, se ha validado el uso de calprotectina en saliva, y se observaron aumentos mayores en animales con sepsis que en

animales con inflamación no séptica o controles. Existe un test comercial (BÜHLMANN fCal Turbo® assay (BÜHLMANN, Laboratories AG, Switzerland)) que permite medir calprotectina de manera automatizada en humana y que ha dado resultados satisfactorios al probarlo en otras especies y tipos de muestra (López-Martínez *et al.*, 2023). Por lo tanto, en este capítulo se utilizó esta prueba comercial para ver, en primer lugar, si era capaz de detectar la calprotectina en saliva de vacas y proporcionar valores adecuados en la validación clínica. Y, en el caso de que se cumpliera la condición anterior, comprobar si se confirmaban los resultados sugeridos en el estudio proteómico (aumento de S100A8, que está íntimamente ligado a la calprotectina) y en otras especies, en la que se observa mayores concentraciones de calprotectina en individuos con sepsis. La validación analítica mostró resultados satisfactorios en términos de precisión y exactitud, mostrando valores dentro del rango de los estándares recomendados (Food and Drug Administration *et al.*, 2013). Además, cuando se midieron los niveles de calprotectina en la saliva de 23 vacas sanas y 14 vacas con metritis, el grupo metritis mostró una mediana 2,56 veces mayor que la del grupo control ($p < 0,001$).

En el suero, de las 155 proteínas identificadas, se observaron variaciones significativas en las abundancias de 22 proteínas, viéndose aumentos en proteínas relacionadas con la respuesta inflamatoria (haptoglobina y glicoproteína ácida alfa-1 (*alpha-1-acid glycoprotein*, AGP)), estrés oxidativo (glutación peroxidasa (*glutathione peroxidase* (Gpox))), inhibición de proteasas y la respuesta proteica (fragmentos de la región variable de la cadena lambda de inmunoglobulinas, endopina 2B, serpina A3-8 y serpina A3-1). Por el contrario, las disminuciones apolipoproteínas (A-IV, C-III y A-II) y la proteína transportadora de retinol podrían reflejar alteraciones en el metabolismo de lípidos y la homeostasis en respuesta a la enfermedad.

El proceso inflamatorio en vacas con metritis se vio evidenciado por el aumento de haptoglobina y AGP, dos proteínas de fase aguda en vacas (Xiao *et al.*, 2015; López-Martínez *et al.*, 2022), entre otras alteraciones. Se observaron niveles más bajos de beta-2-glicoproteína I (*beta-2-glycoprotein I*, β 2GPI) en el suero de las vacas con metritis. Se han descrito menores niveles de esta proteína en pacientes con sepsis (Schrijver *et al.*, 2020) o COVID-19 (Serrano *et al.*, 2021) que en controles, habiéndose atribuido a un

aumento en el consumo de la proteína ante estados de inflamación. Otras proteínas que disminuyeron en el suero de vacas con metritis relacionadas con la inflamación y la infección fueron la transtiretina (también conocida como prealbúmina) (Tóthová *et al.*, 2017), apolipoproteína (Feingold *et al.*, 2008), alfa amilasa (Okolo *et al.*, 1988) y proteína de unión a retinol. En relación a esta última, estudios previos han informado niveles plasmáticos reducidos en vacas después de sepsis (Abd Eldaim *et al.*, 2010) y en el suero de vacas con mastitis (Franco-Martínez *et al.*, 2021).

Los mayores niveles de Gpox en suero de las vacas con metritis sugiere la existencia de un desbalance en el equilibrio redox. La Gpox es un antioxidante intracelular que protege al citoplasma celular de los peróxidos (Darbaz *et al.*, 2019) y se relaciona con la patología de infecciones bacterianas (Brenot *et al.*, 2004), habiéndose descrito aumentada en leche de vacas (Andrei, 2011) y cabras con mastitis (Darbaz *et al.*, 2019).

En los resultados obtenidos, es destacable que ninguna proteína de las que cambiaban significativamente entre los dos grupos se encontró tanto en saliva como en suero. Además, se observó una discrepancia entre el número de proteínas identificadas, y diferencialmente moduladas entre los dos fluidos. Este hecho ya ha sido descrito anteriormente para vacas con mastitis (Franco-Martínez *et al.*, 2021), así como en diferentes enfermedades de otras especies como piometra o tumores mamarios en perras (Franco-Martínez, Gelemanović, *et al.*, 2020; Franco-Martínez, Horvatić, *et al.*, 2020). Por ello, y tal y como se describió en el capítulo anterior, los resultados sugieren que los dos biofluidos responden de manera diferente a la enfermedad, y que su estudio aporta información complementaria para el diagnóstico.

Como conclusiones del Capítulo 3, se determinó que había diferencias en el proteoma de saliva y suero entre vacas sanas y con metritis, mostrando ambos biofluidos respuestas diferentes. Se observaron alteraciones en proteínas relacionadas vías como el sistema inmune, la inflamación, metabolismo lipídico, estrés oxidativo, reparación de ADN y comunicación celular. Sería recomendable realizar nuevos estudios para evaluar las posibles aplicaciones prácticas de estos resultados, tales como posibles nuevas dianas terapéuticas o marcadores diagnósticos. En este sentido, se encontraron 15 proteínas en

saliva y 22 en suero que cambiaban significativamente entre los dos grupos, pudiendo ser posibles marcadores de la enfermedad. Y el estudio proteómico permitió detectar de manera indirecta el posible uso de la calprotectina en saliva en el diagnóstico de vacas con metritis. Los estudios de validación analítica probaron que se podía emplear de manera segura un método comercial y automatizado para su medición, y la validación clínica demostró diferencias estadísticamente significativas entre vacas sanas y con metritis.

En consideración de todo lo anterior, mediante la presente tesis doctoral se ha tratado de valorar el potencial de la saliva para evaluar el estado de salud y bienestar en el ganado vacuno lechero con metritis desde una perspectiva multidisciplinar. En primer lugar, se evaluó si la saliva pudiera ser un fluido con potencial diagnóstico, demostrándose que se podían analizar diferentes biomarcadores en este fluido, y la influencia que podría tener la presencia de alimento en los resultados. A continuación, se descartaron las muestras salivares que podrían tener restos de alimentos y se realizó un estudio bioquímico completo en saliva, o análisis sialoquímico, en vacas sanas y con metritis, observándose diferencias entre los dos grupos. Finalmente, el potencial de la saliva para como fluido diagnóstico en esta enfermedad fue evaluado mediante técnicas proteómicas, detectándose proteínas que se expresan de manera diferente entre animales sanos y con metritis, y usando los datos obtenidos para validar analítica y clínicamente calprotectina (un marcador de sepsis) en saliva en un estudio piloto, mostrando los animales con metritis niveles mayores de este marcador.

9. CONCLUSIONES

De la discusión de los resultados obtenidos en esta Tesis doctoral se pueden derivar las siguientes conclusiones:

1. La contaminación de la saliva con alimento (premezcla, heno y pasto) puede producir cambios en los resultados de los analitos salivales relacionados con el bienestar y el estado de salud que podría influir en la interpretación clínica. Mediante prácticas de manejo como no ofrecer comida antes de la toma de muestras y realizar un proceso de lavado de boca, puede obtenerse salivas más limpias y resultados más consistentes.
2. El análisis bioquímico salivar muestra cambios en marcadores de estrés inflamación, sistema inmune y metabolismo general entre vacas sanas y vacas con metritis. Esto sugiere que la saliva es un biofluido con potencial para el diagnóstico de enfermedades en el ganado vacuno de leche, y en concreto en metritis.
3. Los estudios proteómicos realizados en suero y saliva de vacas sanas y vacas con metritis revelan cambios significativos en la expresión de proteínas. Los resultados sugieren que la patogénesis de la metritis produce cambios en numerosas vías metabólicas como el sistema inmunológico, la inflamación, el metabolismo de lípidos y la homeostasis, el estrés oxidativo, la reparación del ADN, la señalización celular, y en diversas funciones estructurales y mucosas.
4. El análisis proteómico de la saliva sugirió de manera indirecta que la calprotectina podría ser un biomarcador de metritis. Por tanto, la calprotectina en saliva de vacas ha sido validada analítica y clínicamente en esta tesis doctoral por primera vez, confirmando los resultados proteómicos al observarse en concentraciones más altas en vacas con metritis y pudiendo ser un nuevo biomarcador de sepsis en esta especie.
5. Tanto en el análisis bioquímico como en el estudio proteómico, los cambios observados entre saliva y suero eran diferentes, en concordancia con la literatura previa. Esto sugiere que ambos biofluidos podrían tener utilidad diagnóstica, y que el estudio de ambos aporta información complementaria.

10. REFERENCIAS

- Abd Eldaim, M. A. *et al.* (2010) ‘Retinol binding protein 4 in dairy cows: its presence in colostrum and alteration in plasma during fasting, inflammation, and the peripartum period’, *Journal of Dairy Research*. Cambridge University Press, 77(1), pp. 27–32. doi: 10.1017/S0022029909990276.
- Administration, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), C. for V. M. (CVM). (2001) ‘Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation.’ Available at: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ucm070107.pdf>.
- Alexandro Fritzen, Kassio D. Albani, Gustavo Machado, Nathieli B. Bottari, Mariana S. Alves, Maria Rosa C. Schetinger, Vera M. Morsch, Jessica Giuriatti, A. S. da S. (2016) ‘Relation between calcium levels and adenosine deaminase activity in serum in pre- and postpartum of dairy cow’, *Veterinary Population Medicine*, 25(6), pp. 1201–1205.
- Almeida, A. M. *et al.* (2015) ‘Animal board invited review: Advances in proteomics for animal and food sciences’, *Animal*, 9(1), pp. 1–17. doi: 10.1017/S1751731114002602.
- Andrei, S. (2011) ‘Glutathione peroxidase activity and its relationship with somatic cell count, number of colony forming units and protein content in subclinical mastitis cows milk’.
- Aranciaga, N. *et al.* (2020) ‘Proteomics and metabolomics in cow fertility: a systematic review’, *Reproduction (Cambridge, England)*. Reproduction, 160(5), pp. 639–658. doi: 10.1530/REP-20-0047.
- Arora, D. S., Sharma, R. K. and Chandra, P. (2011) ‘Biodelignification of wheat straw and its effect on in vitro digestibility and antioxidant properties’, *International Biodeterioration and Biodegradation*. Elsevier Ltd, 65(2), pp. 352–358. doi: 10.1016/j.ibiod.2010.12.009.
- Bai, Y. *et al.* (2021) ‘Increase in plasma Niemann-Pick disease type C2 protein is associated with poor prognosis of sepsis’, *Scientific reports*. Sci Rep, 11(1). doi: 10.1038/S41598-021-85478-X.

- Barcarolo, D. *et al.* (2022) ‘Application of an optimized and validated LC–MS/MS method for the quantification of free 3-nitrotyrosine in plasma, urine and liver tissue of lactating dairy cows’, *Livestock Science*. Elsevier B.V., 257. doi: 10.1016/j.livsci.2022.104852.
- Barragan, A. A. *et al.* (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*. J Dairy Sci, 101(9), pp. 8248–8258. doi: 10.3168/jds.2018-14510.
- Beunders, R. *et al.* (2020) ‘Endotoxemia-Induced Release of Pro-inflammatory Mediators Are Associated With Increased Glomerular Filtration Rate in Humans in vivo’, *Frontiers in Medicine*. Frontiers Media S.A., 7, p. 559671. doi: 10.3389/FMED.2020.559671/BIBTEX.
- Bilić, P. *et al.* (2023) ‘Serum and urine profiling by high-throughput TMT-based proteomics for the investigation of renal dysfunction in canine babesiosis’, *Journal of Proteomics*, 270(June 2022). doi: 10.1016/j.jprot.2022.104735.
- Botía, M. *et al.* (2024) ‘Measurement of New Biomarkers of Immunity and Welfare in Colostrum and Milk of Pigs: Analytical Validation and Changes During Lactation’, *Biology*. Biology (Basel), 13(10). doi: 10.3390/BIOLOGY13100829.
- Brenot, A. *et al.* (2004) ‘Contribution of Glutathione Peroxidase to the Virulence of *Streptococcus pyogenes*’, *Infection and Immunity*. American Society for Microbiology (ASM), 72(1), p. 408. doi: 10.1128/IAI.72.1.408-413.2004.
- Burnett, T. A. *et al.* (2014) ‘Short communication: Factors affecting hair cortisol concentrations in lactating dairy cows’, *Journal of dairy science*. J Dairy Sci, 97(12), pp. 7685–7690. doi: 10.3168/JDS.2014-8444.
- Casal, N. *et al.* (2017) ‘Analysis of cortisol in hair samples as an indicator of stress in pigs’, *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research*. Elsevier USA, 19, pp. 1–6. doi: 10.1016/J.JVEB.2017.01.002.
- Castillo, C. *et al.* (2001) ‘Importancia del estrés oxidativo en ganado vacuno: en relación con el estado fisiológico (preñez y parto) y la nutrición’, *Archivos de medicina veterinaria*. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, 33(1), pp. 5–20. doi: 10.4067/S0301-732X2001000100001.

- Ceciliani, F. *et al.* (2012) 'Acute phase proteins in ruminants', *Journal of Proteomics*, 75(14), pp. 4207–4231. doi: 10.1016/j.jprot.2012.04.004.
- Cerón, J. J. *et al.* (2023) 'S-100 Proteins: Basics and Applications as Biomarkers in Animals with Special Focus on Calgranulins (S100A8, A9, and A12)', *Biology* 2023, Vol. 12, Page 881. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 12(6), p. 881. doi: 10.3390/BIOLOGY12060881.
- Chan, J. P. W. *et al.* (2010) 'Association of increased serum acute-phase protein concentrations with reproductive performance in dairy cows with postpartum metritis', *Veterinary clinical pathology*. Vet Clin Pathol, 39(1), pp. 72–78. doi: 10.1111/J.1939-165X.2009.00182.X.
- Contreras-Aguilar, M. D. *et al.* (2019) 'Biochemical changes in saliva of cows with inflammation: A pilot study', *Research in Veterinary Science*, 124, pp. 383–386. doi: 10.1016/j.rvsc.2019.04.019.
- Contreras-Aguilar, M. D., Vallejo-Mateo, P. J., *et al.* (2020) 'Changes in saliva analytes associated with lameness in cows: A pilot study', *Animals*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 10(11), pp. 1–10. doi: 10.3390/ani10112078.
- Contreras-Aguilar, M. D., Tvarijonaviciute, A., *et al.* (2020) 'Characterization of total adenosine deaminase activity (ADA) and its isoenzymes in saliva and serum in health and inflammatory conditions in four different species: An analytical and clinical validation pilot study', *BMC Veterinary Research*, 16(1), pp. 1–13. doi: 10.1186/s12917-020-02574-2.
- Contreras-Aguilar, M. D., Hevia, M. L., *et al.* (2020) 'Effect of food contamination and collection material in the measurement of biomarkers in saliva of horses', *Research in Veterinary Science*, 129, pp. 90–95. doi: 10.1016/j.rvsc.2020.01.006.
- Contreras-Aguilar, M. D. *et al.* (2021) 'Changes in saliva analytes in dairy cows during peripartum: A pilot study', *Animals*, 11(3), pp. 1–10. doi: 10.3390/ani11030749.
- Contreras-Aguilar, M. D. and Gómez-García, F. (2020) 'Salivary Glands' Anatomy and Physiology', in *Saliva in Health and Disease*. Cham: Springer International Publishing, pp. 3–21. doi: 10.1007/978-3-030-37681-9_1.
- Cuevas-Córdoba, B. and Santiago-García, J. (2014) 'Saliva: A Fluid of Study for OMICS', *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 18(2), pp. 87–97. doi:

10.1089/omi.2013.0064.

- Darbaz, İ. *et al.* (2019) 'Evaluation of milk glutathione peroxidase and superoxide dismutase levels in subclinical mastitis in Damascus goats', *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. TUBITAK, 43(2), pp. 259–263. doi: 10.3906/VET-1810-60.
- DeCaro, J. A. (2008) 'Methodological considerations in the use of salivary alpha-amylase as a stress marker in field research', *American journal of human biology : the official journal of the Human Biology Council*. Am J Hum Biol, 20(5), pp. 617–619. doi: 10.1002/AJHB.20795.
- Dervishi, E. *et al.* (2016) 'Alterations in innate immunity reactants and carbohydrate and lipid metabolism precede occurrence of metritis in transition dairy cows', *Research in veterinary science*. Res Vet Sci, 104, pp. 30–39. doi: 10.1016/J.RVSC.2015.11.004.
- Dervishi, E. *et al.* (2021) 'Common and specific mineral and metabolic features in dairy cows with clinical metritis, hypocalcaemia or ketosis', *Research in Veterinary Science*. W.B. Saunders, 135, pp. 335–342. doi: 10.1016/j.rvsc.2020.10.012.
- Dillane, P. *et al.* (2020) 'Determining the predictive capability of a Clinical Assessment Scoring Chart to differentiate severity of the clinical consequences of neonatal calf diarrhea relative to gold-standard blood gas analysis', *PLoS ONE*. PLOS, 15(4). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0230708.
- Dohoo, I. R. and Martin, S. W. (1984) 'Disease, production and culling in Holstein-Friesian cows III. Disease and production as determinants of disease', *Preventive Veterinary Medicine*, 2(5), pp. 671–690. doi: 10.1016/0167-5877(84)90013-8.
- Drackley, J. K. (1999) 'Biology of Dairy Cows During the Transition Period: the Final Frontier?', *Journal of Dairy Science*. Elsevier, 82(11), pp. 2259–2273. doi: 10.3168/JDS.S0022-0302(99)75474-3.
- Drillich, M. *et al.* (2007) 'Treatment of acute puerperal metritis with flunixin meglumine in addition to antibiotic treatment', *Journal of dairy science*. J Dairy Sci, 90(8), pp. 3758–3763. doi: 10.3168/JDS.2007-0052.
- Duffield, T. F. *et al.* (2009) 'Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production', *Journal of dairy science*. J Dairy Sci, 92(2), pp. 571–580.

doi: 10.3168/JDS.2008-1507.

- Eckersall, P. D. (2019) 'Review: Proteomic approaches to control lactational parameters in dairy cows', *Animal*. Cambridge University Press, 13(S1), pp. S82–S85. doi: 10.1017/S1751731118003476.
- Edmonson, A. J. *et al.* (1989) 'A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows', *Journal of Dairy Science*. Elsevier, 72(1), pp. 68–78. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(89)79081-0.
- Esfandi, R., Walters, M. E. and Tsopmo, A. (2019) 'Antioxidant properties and potential mechanisms of hydrolyzed proteins and peptides from cereals', *Heliyon*. Heliyon, 5(4). doi: 10.1016/J.HELİYON.2019.E01538.
- Everding, T. (2021) *Cortisol in hair as a measure of chronic stress during sow gestation and the pattern of cortisol in blood during parturition in sows*. South Dakota State University. Available at: <https://openprairie.sdstate.edu/cgi/viewcontent.cgi?%0Aarticle=6756&context=etd>.
- Feingold, K. R. *et al.* (2008) 'Infection and inflammation decrease apolipoprotein M expression', *Atherosclerosis*. Atherosclerosis, 199(1), pp. 19–26. doi: 10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2007.10.007.
- Ferguson, J. D. (2005) 'Nutrition and reproduction in dairy herds', *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*. Vet Clin North Am Food Anim Pract, 21(2), pp. 325–347. doi: 10.1016/J.CVFA.2005.03.001.
- Fontes Baganha, M. *et al.* (1990) 'Serum and pleural adenosine deaminase. Correlation with lymphocytic populations', *Chest*, 97(3), pp. P605-10. doi: <https://doi.org/10.1378/chest.97.3.605>.
- Food and Drug Administration *et al.* (2013) 'Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation', *Draft Version of Non-Binding Recommendation by FDA*, Rev. 1(1–34), pp. 1–41. Available at: <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm> and/or <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/default.htm> (Accessed: 31 March 2021).
- Fourichon, C., Seegers, H. and Malher, X. (2000) 'Effect of disease on reproduction in the dairy cow: A meta-analysis', *Theriogenology*. Theriogenology, 53(9), pp. 1729–

1759. doi: 10.1016/S0093-691X(00)00311-3.

- Franco-Martínez, L., Martínez-Subiela, S., *et al.* (2020) 'Biomarkers of health and welfare: A One Health perspective from the laboratory side', *Research in Veterinary Science*, pp. 299–307. doi: 10.1016/j.rvsc.2019.12.012.
- Franco-Martínez, L., Gelemanović, A., *et al.* (2020) 'Changes in Serum and Salivary Proteins in Canine Mammary Tumors', *Animals*, 10(741), pp. 1–44. doi: doi:10.3390/ani10040741.
- Franco-Martínez, L., Horvatić, A., *et al.* (2020) 'Changes in the salivary proteome associated with canine pyometra', *Frontiers in Veterinary Science*, 7(277). doi: doi: 10.3389/fvets.2020.00277.
- Franco-Martínez, L. *et al.* (2021) 'Changes in saliva proteins in cows with mastitis: A proteomic approach', *Research in Veterinary Science*, 140(March), pp. 91–99. doi: 10.1016/j.rvsc.2021.08.008.
- Franco-Martínez, L. and Castillo-Felipe, C. (2020) 'Saliva as a Non-invasive Sample: Pros and Cons', in *Saliva in Health and Disease*. Cham: Springer International Publishing, pp. 49–65. doi: 10.1007/978-3-030-37681-9_3.
- Franco-Martínez, L., Rubio, C. P. and Contreras-Aguilar, M. D. (2020) 'Methodology Assays for the Salivary Biomarkers' Identification and Measurement', in *Saliva in Health and Disease*. Cham: Springer International Publishing, pp. 67–95. doi: 10.1007/978-3-030-37681-9_4.
- García Pinillos, R. *et al.* (2016) 'One Welfare - a platform for improving human and animal welfare', *The Veterinary record*. Vet Rec, 179(16), pp. 412–413. doi: 10.1136/VR.I5470.
- Garzon, A. *et al.* (2022) 'Defining clinical diagnosis and treatment of puerperal metritis in dairy cows: A scoping review', *Journal of Dairy Science*. American Dairy Science Association, 105(4), pp. 3440–3452. doi: 10.3168/jds.2021-21203.
- Gilbert, R. O. (2016) 'Management of Reproductive Disease in Dairy Cows', *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*. Vet Clin North Am Food Anim Pract, 32(2), pp. 387–410. doi: 10.1016/J.CVFA.2016.01.009.
- Goff, J. P. and Horst, R. L. (1997) 'Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders', *Journal of dairy science*. J Dairy Sci, 80(7), pp.

- 1260–1268. doi: 10.3168/JDS.S0022-0302(97)76055-7.
- Gröhn, Y. T. *et al.* (2003) ‘Optimizing replacement of dairy cows: Modeling the effects of diseases’, *Preventive Veterinary Medicine*. Elsevier, 61(1), pp. 27–43. doi: 10.1016/S0167-5877(03)00158-2.
- Grondin, J. A. *et al.* (2020) ‘Mucins in Intestinal Mucosal Defense and Inflammation: Learning From Clinical and Experimental Studies’, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., 11, p. 559710. doi: 10.3389/FIMMU.2020.02054/BIBTEX.
- Grummer, R. R. (1995) ‘Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow’, *Journal of animal science*. J Anim Sci, 73(9), pp. 2820–2833. doi: 10.2527/1995.7392820X.
- Hammon, D. S. *et al.* (2006) ‘Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders’, *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Vet Immunol Immunopathol, 113(1–2), pp. 21–29. doi: 10.1016/j.vetimm.2006.03.022.
- Hayirli, A. *et al.* (2002) ‘Animal and dietary factors affecting feed intake during the prefresh transition period in Holsteins’, *Journal of dairy science*. J Dairy Sci, 85(12), pp. 3430–3443. doi: 10.3168/JDS.S0022-0302(02)74431-7.
- Herd, T. H. (2000) ‘Ruminant adaptation to negative energy balance. Influences on the etiology of ketosis and fatty liver’, *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*. Vet Clin North Am Food Anim Pract, 16(2). doi: 10.1016/S0749-0720(15)30102-X.
- Horvatić, A. *et al.* (2019) ‘Quantitative proteomics using tandem mass tags in relation to the acute phase protein response in chicken challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide endotoxin’, *Journal of Proteomics*. Elsevier, 192, pp. 64–77. doi: 10.1016/j.jprot.2018.08.009.
- Huzzey, J. M. *et al.* (2009) ‘Short communication: Haptoglobin as an early indicator of metritis’, *Journal of dairy science*. J Dairy Sci, 92(2), pp. 621–625. doi: 10.3168/JDS.2008-1526.
- Ingvartsen, K. L. and Moyes, K. (2013) ‘Nutrition, immune function and health of dairy cattle’, *Animal*. Animal, 7(SUPPL.1), pp. 112–122. doi: 10.1017/S175173111200170X.
- J. Hirvonen, G. Huszenicza, M. Kulcsár, S. P. (1997) ‘Acute-phase response in dairy cows

- with acute postpartum metritis', *Theriogenology*, 51(6), pp. 1071–1083.
- Jukic, A. *et al.* (2021) 'Calprotectin: from biomarker to biological function', *Gut*. BMJ Publishing Group, 70(10), p. 1978. doi: 10.1136/GUTJNL-2021-324855.
- Kaczmarowski, M., Malinowski, E. and Markiewicz, H. (2006) 'Some hormonal and biochemical blood indices in cows with retained placenta and puerperal metritis', *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 50(1), pp. 89–92.
- Kane S.P. (2024) *Post. ClinCalc*. Available at: <https://clincalc.com/stats/Power.aspx> (Accessed: 9 September 2024).
- Kim, J. W. *et al.* (2022) 'S100A8 in Serum, Urine, and Saliva as a Potential Biomarker for Systemic Lupus Erythematosus', *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., 13, p. 886209. doi: 10.3389/FIMMU.2022.886209/BIBTEX.
- Kjelgaard-Hansen, M. and Jacobsen, S. (2011) 'Assay Validation and Diagnostic Applications of Major Acute-phase Protein Testing in Companion Animals', *Clinics in Laboratory Medicine*. doi: 10.1016/j.cll.2010.10.002.
- Ko, D. C. *et al.* (2003) 'The integrity of a cholesterol-binding pocket in Niemann-Pick C2 protein is necessary to control lysosome cholesterol levels', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Proc Natl Acad Sci U S A, 100(5), pp. 2518–2525. doi: 10.1073/PNAS.0530027100.
- Kocharunchitt, C. *et al.* (2012) 'Integrated Transcriptomic and Proteomic Analysis of the Physiological Response of Escherichia coli O157:H7 Sakai to Steady-state Conditions of Cold and Water Activity Stress', *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 11(1). doi: 10.1074/MCP.M111.009019.
- Kukla, A. *et al.* (2014) 'Cystatin C Enhances Glomerular Filtration Rate Estimating Equations in Kidney Transplant Recipients', *American Journal of Nephrology*. S. Karger AG, 39(1), pp. 59–65. doi: 10.1159/000357594.
- Lamy, E. and Mau, M. (2012) 'Saliva proteomics as an emerging, non-invasive tool to study livestock physiology, nutrition and diseases', *Journal of Proteomics*, 75(14), pp. 4251–4258. doi: 10.1016/j.jprot.2012.05.007.
- Leblanc, S. (2010) 'Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period', *The Journal of reproduction and development*. J Reprod Dev, 56 Suppl(SUPPL.).

doi: 10.1262/JRD.1056S29.

- Lebreton, J. P. *et al.* (1979) 'Serum concentration of human alpha 2 HS glycoprotein during the inflammatory process: evidence that alpha 2 HS glycoprotein is a negative acute-phase reactant.', *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation, 64(4), p. 1118. doi: 10.1172/JCI109551.
- Leja, M. *et al.* (2001) 'Antioxidant ability of broccoli flower buds during short-term storage', *Food Chemistry*, 72(2), pp. 219–222. doi: 10.1016/S0308-8146(00)00224-7.
- Liu, C. L. and Shi, G. P. (2019) 'Calcium-activated chloride channel regulator 1 (CLCA1): More than a regulator of chloride transport and mucus production', *The World Allergy Organization journal*. World Allergy Organ J, 12(11). doi: 10.1016/J.WAOJOU.2019.100077.
- Llamas-Amor, E. *et al.* (2024) 'Cystatin C, Ammonia, and Bicarbonate Measurements in the Saliva of Pigs: Analytical Validation and Changes in *S. suis* Infection', *Animals* 2024, Vol. 14, Page 1580. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 14(11), p. 1580. doi: 10.3390/ANI14111580.
- De Loor, J. *et al.* (2013) 'Urinary biomarkers for acute kidney injury in dogs', *Journal of veterinary internal medicine*. J Vet Intern Med, 27(5), pp. 998–1010. doi: 10.1111/JVIM.12155.
- López-Martínez, M. J. *et al.* (2022) 'Biomarkers of sepsis in pigs, horses and cattle: From acute phase proteins to procalcitonin', *Animal Health Research Reviews*, pp. 82–99. doi: 10.1017/S1466252322000019.
- López-Martínez, M. J. *et al.* (2023) 'Measurement of Calprotectin (S100A8/A9) in the Saliva of Pigs: Validation Data of A Commercially Available Automated Assay and Changes in Sepsis, Inflammation, and Stress', *Animals : an open access journal from MDPI*. Animals (Basel), 13(7). doi: 10.3390/ANI13071190.
- Malledevarahalli Chandrappa, S. *et al.* (2023) 'Circulating and endometrial cell oxidative stress in dairy cows diagnosed with metritis', *Theriogenology*. Elsevier Inc., 198, pp. 217–223. doi: 10.1016/j.theriogenology.2022.12.045.
- Mallikarjunappa, S. *et al.* (2019) 'Characterization of the bovine salivary gland transcriptome associated with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

- experimental challenge', *BMC Genomics*, 20(1), p. 491. doi: 10.1186/s12864-019-5845-4.
- Martínez-Subiela, S. *et al.* (2017) 'Identification of novel biomarkers for treatment monitoring in canine leishmaniosis by high-resolution quantitative proteomic analysis', *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 191, pp. 60–67. doi: 10.1016/j.cimid.2016.10.002.
- Martinez, N. *et al.* (2014) 'Effect of induced subclinical hypocalcemia on physiological responses and neutrophil function in dairy cows', *Journal of dairy science*. J Dairy Sci, 97(2), pp. 874–887. doi: 10.3168/JDS.2013-7408.
- Mellor, D. J. (2016) 'Updating Animal Welfare Thinking: Moving beyond the "Five Freedoms" towards "A Life Worth Living"', *Animals : an Open Access Journal from MDPI*. MDPI AG, 6(3), p. 21. doi: 10.3390/ANI6030021.
- Mikulková, K. *et al.* (2020) 'Evaluation of oxidant/antioxidant status, metabolic profile and milk production in cows with metritis', *Irish Veterinary Journal*. Irish Veterinary Journal, 73(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/s13620-020-00161-3.
- Miller, J. K., Brzezinska-Slebozinska, E. and Madsen, F. C. (1993) 'Oxidative stress, antioxidants, and animal function', *Journal of dairy science*. J Dairy Sci, 76(9), pp. 2812–2823. doi: 10.3168/JDS.S0022-0302(93)77620-1.
- Min, L. *et al.* (2016) 'Long-term heat stress induces the inflammatory response in dairy cows revealed by plasma proteome analysis', *Biochemical and biophysical research communications*. Biochem Biophys Res Commun, 471(2), pp. 296–302. doi: 10.1016/J.BBRC.2016.01.185.
- Nunes, L. A. S. and Macedo, D. V. De (2013) 'Saliva as a diagnostic fluid in sports medicine: potential and limitations', *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. Sociedade Brasileira de Patologia Clínica, , 49(4), pp. 247–255. doi: 10.1590/S1676-24442013000400003.
- Okolo, A. A. *et al.* (1988) 'Decreased Serum Alpha-Amylase Levels in Infected Nigerian Newborn Infants', *Neonatology*. S. Karger AG, 53(3), pp. 138–143. doi: 10.1159/000242774.
- Omur, A. *et al.* (2016) 'Effects of antioxidant vitamins (A, D, E) and trace elements (Cu, Mn, Se, Zn) on some metabolic and reproductive profiles in dairy cows during

- transition period', *Polish journal of veterinary sciences*. Pol J Vet Sci, 19(4), pp. 697–706. doi: 10.1515/PJVS-2016-0088.
- Paiano, R. B. *et al.* (2021) 'Metritis in dairy cows is preceded by alterations in biochemical profile prepartum and at parturition', *Research in Veterinary Science*. Elsevier Ltd, 135(October 2020), pp. 167–174. doi: 10.1016/j.rvsc.2021.01.015.
- Palme, R. (2012) 'Monitoring stress hormone metabolites as a useful, non-invasive tool for welfare assessment in farm animals', *Animal Welfare*, 21(3), pp. 331–337. doi: 10.7120/09627286.21.3.331.
- Park, A. F. *et al.* (2002) 'Effect of protein level in prepartum diets on metabolism and performance of dairy cows', *Journal of dairy science*. J Dairy Sci, 85(7), pp. 1815–1828. doi: 10.3168/JDS.S0022-0302(02)74256-2.
- Piibor, J. *et al.* (2024) 'Investigation of Uterine Fluid Extracellular Vesicles' Proteomic Profiles Provides Novel Diagnostic Biomarkers of Bovine Endometritis', *Biomolecules*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 14(6), p. 626. doi: 10.3390/BIOM14060626/S1.
- Piñeiro, J. M. *et al.* (2019) 'Associations of pre- and postpartum lying time with metabolic, inflammation, and health status of lactating dairy cows', *Journal of dairy science*. J Dairy Sci, 102(4), pp. 3348–3361. doi: 10.3168/JDS.2018-15386.
- Pohl, A., Burfeind, O. and Heuwieser, W. (2015) 'The associations between postpartum serum haptoglobin concentration and metabolic status, calving difficulties, retained fetal membranes, and metritis', *Journal of dairy science*. J Dairy Sci, 98(7), pp. 4544–4551. doi: 10.3168/JDS.2014-9181.
- Rajala, P. J. and Gröhn, Y. T. (1998) 'Effects of dystocia, retained placenta, and metritis on milk yield in dairy cows', *Journal of dairy science*. J Dairy Sci, 81(12), pp. 3172–3181. doi: 10.3168/JDS.S0022-0302(98)75883-7.
- Ramírez V., N. *et al.* (2002) 'Prevalencia de niveles séricos de haptoglobina en bovinos adultos, de cuatro hatos de Antioquia', *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, ISSN-e 0120-0690, Vol. 15, N°. 2, 2002, págs. 160-168. Facultad de Ciencias Agrarias, 15(2), pp. 160–168. Available at: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3242544&info=resumen&idioma=SPA> (Accessed: 19 December 2024).

- Rial, C. *et al.* (2023) 'Metritis and clinical mastitis events in lactating dairy cows were associated with altered patterns of rumination, physical activity, and lying behavior monitored by an ear-attached sensor', *Journal of Dairy Science*. American Dairy Science Association, 106(12), pp. 9345–9365. doi: 10.3168/jds.2022-23157.
- Róth, E. (1997) 'Oxygen free radicals and their clinical implications.', *Acta chirurgica Hungarica*.
- Schrijver, I. T. *et al.* (2020) 'Beta-2-glycoprotein 1 as a biomarker for sepsis in critically ill patients in the intensive care unit: a prospective cohort study', *Critical care (London, England)*. Crit Care, 24(1). doi: 10.1186/S13054-020-03066-3.
- Serrano, M. *et al.* (2021) 'Beta-2-Glycoprotein-I Deficiency Could Precipitate an Antiphospholipid Syndrome-like Prothrombotic Situation in Patients With Coronavirus Disease 2019', *ACR open rheumatology*. ACR Open Rheumatol, 3(4), pp. 267–276. doi: 10.1002/ACR2.11245.
- Sheldon, I. M. *et al.* (2006) 'Defining postpartum uterine disease in cattle', *Theriogenology*. Theriogenology, 65(8), pp. 1516–1530. doi: 10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2005.08.021.
- Sondej, M. *et al.* (2009) 'Glycoproteomic profiling of the Human Salivary Proteome', *Clinical proteomics*. Clin Proteomics, 5(1), pp. 52–68. doi: 10.1007/S12014-008-9021-0.
- Stojkov, J. *et al.* (2015) 'Assessment of visceral pain associated with metritis in dairy cows', *Journal of Dairy Science*. Elsevier Inc., 98(8), pp. 5352–5361. doi: 10.3168/jds.2014-9296.
- Strahler, J. *et al.* (2017) 'Simultaneous measurement of salivary cortisol and alpha-amylase: Application and recommendations', *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. Elsevier, 83(August), pp. 657–677. doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.08.015.
- Sun, Q. *et al.* (2021) 'S100A7 promotes the development of human endometriosis by activating NF-κB signaling pathway in endometrial stromal cells', *Cell biology international*. Cell Biol Int, 45(6), pp. 1327–1335. doi: 10.1002/CBIN.11578.
- Tallo-Parra, O. *et al.* (2014) 'Hair cortisol detection in dairy cattle by using EIA: Protocol validation and correlation with faecal cortisol metabolites', *Animal*. Cambridge University Press, 9(6), pp. 1059–1064. doi: 10.1017/S1751731115000294.
- Tecles, F. and Cerón, J. J. (2001) 'Determination of whole blood cholinesterase in

- different animal species using specific substrates', *Research in Veterinary Science*. W.B. Saunders, 70(3), pp. 233–238. doi: 10.1053/RVSC.2001.0465.
- Tóthová, C. *et al.* (2017) 'Transthyretin in the Evaluation of Health and Disease in Human and Veterinary Medicine', *Pathophysiology - Altered Physiological States*. IntechOpen. doi: 10.5772/INTECHOPEN.68725.
- USDA–APHIS–VS–CEAH–NAHMS (2021) *Dairy 2014, "Trends in Dairy Cattle Health and Management Practices in the United States, 1991-2014"*. Available at: <http://nahms.usda.aphis.gov>.
- Vallejo-Mateo, P. J. *et al.* (2024) 'Saliva as a Potential Source of Biomarkers in Cows with Metritis: A Pilot Study', *Veterinary Sciences*. Vet Sci, 11(9). doi: 10.3390/vetsci11090446.
- Vázquez-Autón J, Gil-Cano F, Latorre-Reviriego R, Ramírez-Zarzosa G, López-Albors O, A. M. (2022) *Manual de Prácticas de Anatomía Veterinaria: Sistemas Viscerales*. 1st edn. Edited by D. Marín. Murcia.
- Vesel, U. *et al.* (2020) 'Welfare assessment in dairy cows using hair cortisol as a part of monitoring protocols', *The Journal of dairy research*. J Dairy Res, 87(S1), pp. 72–78. doi: 10.1017/S0022029920000588.
- Westermeier, R., Naven, T. and Höpker, H. R. (2008) *Proteomics in Practice: A Guide to Successful Experimental Design: Second Edition*, *Proteomics in Practice: A Guide to Successful Experimental Design: Second Edition*. Wiley-VCH. doi: 10.1002/9783527622290.
- Xiao, K. *et al.* (2015) 'α-1-Acid glycoprotein as a biomarker for the early diagnosis and monitoring the prognosis of sepsis', *Journal of critical care*. J Crit Care, 30(4), pp. 744–751. doi: 10.1016/J.JCRC.2015.04.007.
- Yoshizawa, J. M. *et al.* (2013) 'Salivary biomarkers: Toward future clinical and diagnostic utilities', *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology, 26(4), pp. 781–791. doi: 10.1128/CMR.00021-13.
- Young, C. R. *et al.* (1996) 'Serum haptoglobin concentrations in a population of feedlot cattle.', *American Journal of Veterinary Research*, 57(2), pp. 138–141. doi: 10.2460/ajvr.1996.57.02.138.

Apéndices

Apéndice 1. Listado de Figuras

Figura 1: Puntuación para la evaluación clínica de la deshidratación y acidosis (Dillane <i>et al.</i> , 2020).	21
Figura 2: Grados de condición corporal (Edmonson <i>et al.</i> , 1989).	22
Figura 3 Ejemplo de toma de muestra de saliva en una vaca en las colleras	24
Figura 4: Representación de los protocolos realizados para realizar in vitro la simulación de la contaminación de saliva con diferentes alimentos.	33
Figura 5: Cambios de color en la saliva (a) y agua destilada (b) tras la adición de los diferentes alimentos in vitro.	34
Figura 6: Coeficientes de variación (CV) de las medias (n=5) de las alícuotas C2 (pool de saliva de vacas sometido a incubación durante 5 min a 38°C), F, H y G (pool de saliva de vacas sometido a incubación con 250 mg de alimento basado en una premezcla estándar usado en vacas en lactación, heno de trigo y pasto, respectivamente) comparado con su alícuota de control C1(pool de saliva limpia).	39
Figura 7: Gráfico de volcán que muestra las proteínas en saliva con mayor (color rojo) y menor (color azul) abundancia relativa entre los controles (N=5) y las vacas con metritis (N=5). Un valor positivo de Log2 (FC) indica un aumento de la expresión en metritis, mientras que un valor negativo indica una subexpresión en metritis.	49
Figura 8: Gráfico de volcán que muestra las proteínas séricas con mayor (color rojo) y menor (color azul) abundancia relativa entre los controles (N=5) y las vacas con metritis (N=5). Un valor positivo de Log2 (FC) indica un aumento de la expresión en metritis, mientras que un valor negativo indica una subexpresión en metritis.	50
Figura 9: Calprotectina en saliva de vacas sanas (n=23) y vacas con metritis (n=14). ***: P<0,001.	51
Figura 10: Número de entradas para el término “saliva” en PubMed, apreciándose un incremento progresivo en el número de resultados con el paso de los años.	54
Figura 11: Ejemplo de procedimiento de lavado de boca en una vaca.	58

Apéndice 2. Listado de Tablas

Tabla 1: Medias y desviaciones estándar (SD) de las cinco réplicas de las mediciones del perfil sialoquímico en las alícuotas de saliva en vacas marcadas como C1 (saliva limpia), C2 (saliva limpia tras ser incubada durante 5 min a 38°C), F (saliva incubada con una premezcla normalmente ofrecida a vacas en lactación), H (saliva incubada con heno de trigo) y G (saliva incubada con pasto); y de las alícuotas de agua ionizada marcadas como C2w (agua incubada durante 5 min a 38°C), Fw (agua incubada con una premezcla normalmente ofrecida a vacas en lactación), Hw (agua incubada con heno de trigo) y Gw (agua incubada con pasto).	36
Tabla 2: Parámetros descriptivos de los animales sanos y con metritis empleados en el Capítulo 2.	42
Tabla 3: Biomarcador, origen de los reactivos y resultados de validación analítica (límite bajo de detección: LLOD, coeficiente de variabilidad intraensayo: CV y coeficiente de linealidad: R ²) para saliva y suero de vacas.	43
Tabla 4: Signos clínicos y concentración de SAA individuales de los animales usados para el estudio proteómico del Capítulo 3.	47
Tabla 5: Proteínas con cambios significativos en saliva entre vacas sanas y con metritis.	48
Tabla 6: Proteínas con cambios significativos en suero entre vacas sanas y con metritis.	49

Apéndice 3 Factor de impacto y cuartiles de los artículos derivados de los capítulos de esta tesis, según Journal Citation Reports (JCR).

* Últimos datos disponibles a fecha 12/12/2024, por lo que se muestran os datos de 2023.

Capítulo	Revista	Año de publicación	Factor de impacto	Cuartil (%)	Categoría
1	BMC Veterinary Research	2022	2.6	Q1 (85.8%)	Ciencias veterinarias
2	Veterinary Sciences	2024	2 *	Q2 (74.6%)*	Ciencias veterinarias