



Plan de Gestión de Datos

INFORMACIÓN SOBRE EL PROYECTO

1. – Datos del Proyecto

- Título del Proyecto (en castellano)

“Evaluación del flujo sanguíneo y de factores angiogénicos en el hígado y su relación con procesos inflamatorios durante el período de transición en vacas lecheras”

- Título del Proyecto (en inglés)

"Evaluation of blood flow and angiogenic factors in the liver and its relationship with inflammatory processes during the transition period in dairy cows”.

- Descripción del Proyecto (en castellano) Resumen

La salud animal es un eslabón fundamental en la producción pecuaria y cualquier alteración fisiológica en la vaca puede provocar reducción de los índices productivos. La producción bovina lechera se ha caracterizado en las últimas décadas por la aplicación de un proceso de intensificación para incrementar la producción láctea. Las vacas lecheras sufren alteraciones metabólicas asociadas a etapas adaptativas durante toda su vida. El periodo de transición que gira alrededor del parto, constituye una etapa caracterizada por importantes modificaciones en el estado endocrino de las vacas que las prepara para el parto y la lactogénesis y se relaciona con importantes modificaciones metabólicas, fisiológicas y anatómicas que sufren los animales. Además, están expuestas a desafíos inflamatorios en la lactancia temprana, y existen evidencias de procesos inflamatorios dentro del tejido hepático. En respuesta a la inflamación, el organismo aumenta la expresión y la liberación de mediadores, quienes forman redes reguladoras complejas para promover un mayor flujo de sangre al tejido, infiltración y activación de células inmunes, y respuestas sistémicas. En el presente proyecto proponemos como objetivo general evaluar el flujo sanguíneo hepático y la expresión de factores angiogénicos, y su relación con la inflamación en el hígado de vacas lecheras de alta y baja producción durante este período crítico. Para ello se utilizarán técnicas de ultrasonografía doppler y se analizarán distintos factores que regulan y caracterizan la inflamación y angiogénesis en el tejido hepático de vacas lecheras con diferentes volúmenes productivos. Consideramos que este proyecto aportará datos relevantes y permitirá caracterizar posibles marcadores de animales transitando el período de transición que podrían contribuir a generar herramientas diagnósticas, preventivas y/o de terapéutica veterinaria, para poder así lograr un mejor manejo animal y en consecuencia, mejores resultados productivos y económicos.

- Descripción del Proyecto (en inglés) Resumen

Animal health is a fundamental link in livestock production and any physiological alteration in the cow can cause a reduction in production rates. Dairy cattle production has been characterized in recent decades by the application of an intensification process to increase milk production. Dairy cows suffer metabolic alterations associated with adaptive stages throughout their lives. The transition period around birth constitutes a stage characterized by important modifications in the endocrine state of cows that prepares them to birth and lactogenesis and is related to important metabolic, physiological and anatomical modifications that animals suffer. In addition, they are exposed to inflammatory challenges in early lactation, and there is evidence of inflammatory processes within liver tissue. In response to inflammation, the body increases the expression and release of mediators, who form complex regulatory networks to promote



increased blood flow to the tissue, infiltration and activation of immune cells, and systemic responses. In the present project we propose as a general objective to evaluate the hepatic blood flow and the expression of angiogenic factors, and its relation with the inflammation in the liver of dairy cows of high and low production during this critical period. For this, Doppler ultrasound techniques will be used and different factors that regulate and characterize inflammation and angiogenesis in the liver tissue of dairy cows with different productive volumes will be analyzed. We believe that with the possible execution of this project, we could provide relevant data and characterize possible markers of animals transiting the transition period that could contribute to generate diagnostic, preventive and / or veterinary therapeutic tools, in order to achieve better animal management and consequently, better productive and economic results.

- Palabras Claves descriptivas del Proyecto (en castellano)

Bovinos
Flujo sanguíneo
Metabolismo

- Palabras Claves descriptivas del Proyecto (en inglés)

Bovine
Blood flow
Metabolism

2 – Datos del Director/ar del Proyecto

- Nombre y Apellido: Valentina Matiller

- Unidad Académica: Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral

- Teléfono oficial de contacto: 03496-428575

-Teléfono móvil de contacto: 03496-15524117

-E-mail del Director/a del Proyecto: vmatiller@fcv.unl.edu.ar

DATOS RESULTANTES DE LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

-Describa la toma de muestras / datos a realizar

Con respecto a los aspectos éticos los procedimientos a efectuar con animales experimentales, serán realizados de acuerdo a la guía internacional de la FASS (Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching, Tercera Edición, Federation of Animal Science Societies, 2010). A su vez, estos procedimientos han sido evaluados y aprobados por el Comité de Ética y Seguridad de la FCV-UNL con el número de protocolo 587/20.

En el desarrollo de este ensayo planteamos trabajar con vacas Holando Argentino puras por cruce, de un establecimiento ubicado en Las Colonias cuyo sistema de producción es semi-intensivo, con un promedio anual de 400 vacas en ordeño y un promedio de producción de leche individual anual de 24 litros. Se seleccionarán animales previamente, incluyendo aquellos que no presenten signos clínicos de enfermedad y sean sanitariamente aptos. Serán divididos en dos categorías de acuerdo al nivel de producción de leche promedio anual como de baja producción igual o menor a 6000 litros de leche a 305 días y de alta producción igual o mayor a 8000 litros de leche a 305



días. Trabajaremos con 20 animales en cada una de estas categorías, que serán monitoreados y muestreados durante el PT. Los animales serán alimentados en la etapa preparto con raciones totalmente mezcladas (TMR) a base de ensilaje de maíz, paja de trigo, grano de maíz, harina de soja y heno de gramíneas. En el posparto se usarán raciones parcialmente mezcladas (PMR) compuestas a base de ensilado de maíz, granos de maíz con harina de soja y pastoreo de alfalfa y ray grass. Todos los alimentos serán enviados al laboratorio para su análisis de calidad. Los requerimientos nutricionales específicos de los animales en el período estudiado, serán fijados en base a las tablas del National Research Council 2001, para ganado bovino lechero. Durante el periodo de preparto los animales permanecerán en corrales a cielo abierto, con aguadas y sombras artificiales para brindar confort. El suministro de la TMR se realizará en comederos con un frente de 75 cm por animal (asegurando de que todas las vacas tengan acceso a la ración en el mismo momento). El consumo de materia seca (CMS) diario para vacas individuales se estimará utilizando las ecuaciones descriptas en NRC (2001) para vacas preparto y vacas lactantes. El consumo de materia seca será también cuantificado a nivel de corral de acuerdo con el total de materia seca ofrecida menos el remanente. Estas mediciones se realizarán para corroborar que las estimaciones individuales de CMS son aceptables y cercanas a la realidad. El peso vivo (PV) y la CC de los animales se tomará al ingreso al preparto, al parto y en cada uno de los puntos de muestreo planteados en la figura 1 y siempre se registrará la CC por el mismo operador de acuerdo a la escala descripta por Wathes y col. (2007). Además, se relevarán sus datos productivos, reproductivos y de eventos ocurridos en el período estudiado que se consideren de relevancia para la investigación.

El plan de muestreo del estudio consiste en la toma de muestras de cada animal en diferentes momentos del PT y a los 90 días posparto. Este último punto de muestreo permitirá determinar la evolución de las variables en animales que comienzan a estabilizarse en sus funciones, ya pasado el pico de su producción láctea y con un aumento en el consumo de materia seca. Se tomarán muestras de sangre y se realizará el monitoreo ecográfico del hígado (modo B y Doppler) a los 21 y 7 días preparto, y a los días 7, 14, 21, 60 y 90 días posparto. Además se tomarán muestras hígado a través de biopsias hepáticas realizadas al día 21 preparto y 7, 21, 60 y 90 días posparto. Estas actividades se llevarán a cabo después del ordeño de la mañana. Se contempla una variación en los días planteados de ± 2 días para los muestreos de los días 7 preparto y 7 posparto, y de ± 4 para los días 21 preparto y 14, 21, 60 y 90 posparto. Si no se pudieran cumplir estos plazos por condiciones inherentes al sistema productivo, condiciones climáticas, entre otras causas; esos animales con muestreos desplazados, quedarán descartados del estudio, reemplazándose por otros reclutados del mismo rodeo. El plan de muestreo será realizado durante los meses de abril, mayo, junio, julio, agosto y septiembre, coincidiendo con el período de parición de otoño-invierno. Se realizará un examen ecográfico completo del hígado puede brindar información detallada acerca del patrón ultrasonográfico del parénquima hepático, la topografía de los vasos sanguíneos. Además, la ultrasonografía permite realizar de manera segura biopsias hepáticas guiadas. La evaluación subjetiva del hígado por ecografía incluye el estudio del parénquima, la vena cava caudal, las venas hepáticas, la vena porta y sus ramas, y arteria hepática y sus ramas.

En los días de monitoreo programados según el diseño del estudio (Figura 1) se realizarán mediciones del flujo sanguíneo hepático a través de ultrasonografía Doppler utilizando un ecógrafo portátil Doppler color Z6 Vet (Mindray, China), acoplado a un transductor convexo trans-abdominal de 3,5 MHz de frecuencia central (3C5P, Mindray). Se utilizará el modo B de escaneo en tiempo real asociado a las funciones de Doppler color y Doppler pulsado o espectral, para evaluar la dinámica del flujo sanguíneo a nivel de la vena porta hepática y sus ramas (izquierda y derecha), así como de las ramas derechas de la arteria y vena hepáticas. Brevemente, se realizará tricotomía sobre el lado derecho del animal a nivel del 7mo y 12vo espacio intercostal. El hígado será escaneado en modo B y Doppler color para localizar los vasos



hepáticos anteriormente descriptos y verificar que no existan patologías observables a nivel del parénquima hepático. Una vez localizados los vasos, se evaluará el flujo sanguíneo a través de la función Doppler pulsado o espectral. Teniendo en cuenta que los movimientos respiratorios producen cambios de presión dentro de las cavidades torácica y abdominal que afectan la pulsatilidad y el flujo sanguíneo dentro de los vasos hepáticos (Abu-Yousef, 1992), las imágenes serán tomadas solamente durante la inspiración para evitar esta fuente de variación. Para una correcta determinación del flujo sanguíneo, el transductor se colocará en un ángulo de interacción menor a 60° y se utilizará en todos los casos una compuerta de muestreo de 1 mm. Las imágenes de los espectros Doppler serán guardadas. Se calcularán mediante el software del instrumento los siguientes parámetros: índice de pulsatilidad (IP), índice de resistencia (IR), índice sistólico-diastólico (S/D), velocidad sistólica máxima (PS), velocidad diastólica final (ED) y tiempo promedio de máxima velocidad (TAMV), además se calculará el diámetro y área del vaso en estudio. Durante todo el procedimiento se guardarán imágenes y videos en el equipo de ultrasonografía para su posterior análisis (Starke y col., 2011; Hart y col., 2018). Se tomará el volumen del flujo sanguíneo (VFS).

Las muestras de sangre obtenidas serán destinadas a la realización de hemogramas y la obtención de plasma y suero. Las muestras de sangre entera serán colectadas en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), mantenidas en condiciones de refrigeración de 2 a 8°C y de manera inmediata se procederá a su evaluación en un autoanalizador hematológico. Para la obtención de plasma, se colectará la sangre en tubos con EDTA, serán mantenidas en condiciones de refrigeración y se centrifugarán inmediatamente. En el caso de suero las muestras serán colocadas en estufa a 37°C durante 1 hora para favorecer la coagulación, luego refrigeradas a 4°C por 2 horas para una mejor retracción del coagulo sanguíneo y posteriormente centrifugadas. Tanto suero como plasma serán colocados en tubos para ser conservados a -80°C.

Para realizar la punción biopsia guiada por ecografía de hígado se utilizará la técnica descrita por Buckley (1986) con algunas modificaciones (Angeli y col., 2019b). La localización mediante ecografía Doppler de los vasos de mayor calibre dentro del hígado se tendrá en cuenta para evitar perforarlos durante la realización del procedimiento de biopsia. La técnica se practicará en el onceavo espacio intercostal derecho a la altura del trocánter mayor del fémur. Los animales serán sedados mediante la administración endovenosa de xilacina 2% (dosis: 0,05 mg/kg de peso corporal), posteriormente se realizará la anestesia local del área a incidir infiltrando la zona con lidocaína 2%, continuándose con la limpieza y antisepsia del área. Luego se practicará una pequeña incisión en piel a punta de bisturí, introduciendo por esta abertura la aguja de biopsia tipo tru-cut descrita por Buckley (1986) modificada ad hoc. A partir de este momento todas las maniobras serán guiadas por ecografía utilizando un sistema de ultrasonido (Z6 Vet, Mindray) con un transductor microconvexo de 6,5 MHz de frecuencia central (6C2P, Mindray). Luego de la intervención se realizará la desinfección de la zona y la colocación de antiparasitarios externos y antibióticos de amplio espectro vía parenteral. Las muestras obtenidas de hígado tendrán dos destinos:

-aproximadamente 300 mg de tejido serán congelados en nitrógeno líquido y conservados a -80°C hasta su procesamiento para la extracción de proteínas y posterior realización mediante análisis por Western blot,

-otra muestra será destinada al análisis histopatológico y análisis mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, para lo cual serán fijadas en formaldehído tamponado al 4% y procesadas de acuerdo a las técnicas histológicas de rutina.

Es importante resaltar que como se indicó al inicio la toma de muestras y el posterior procesamiento de las mismas en el laboratorio para la aplicación de técnicas comprendidas en este proyecto fue aprobada por el comité de ética de la FCV UNL.



--

- Datos: ¿Existe alguna razón por la cual los datos declarados no deban ser puestos a disposición de la comunidad/ser de acceso público? (marque X)	
X	NO
SI. Elija una de las opciones:	
	a) Se encuentra en evaluación de protección por medio de patentes b) No se inició el proceso de evaluación de patentabilidad, pero podría ser protegible c) Existe un contrato con un tercero que impide la divulgación d) Otro. Justifique.
- Período de Confidencialidad: Es el período durante el cual los datos no deberían ser publicados, contado a partir del momento de la toma de los mismos. El período máximo para la no publicación es de 5 (CINCO) años posteriores a su obtención. Luego de este periodo, los datos estarán disponibles para la comunidad/serán de acceso público. Si Ud. considera que este tiempo es insuficiente, y necesita prorrogar el período de confidencialidad, indique sus motivos y la cantidad de años adicionales que considera necesarios. Marque su opción con "X".	
	1 (UN) año
	2 (DOS) años
	3 (TRES) años
	4 (CUATRO) año
	5 (CINCO) años
X	Otro.
	Motivos: Se solicita confidencialidad debido a que los resultados serán parte de una publicación científica en una revista especializada del área, para lo cual es necesario que los datos no hayan sido publicados con anterioridad.

Esperanza It. Fe, 28/04/2020



INSTRUCTIVO PARA COMPLETAR EL PLAN DE GESTIÓN (PGD)

El PGD no es un documento definitivo, sino que se desarrollará a lo largo del ciclo de vida del proyecto.

INFORMACIÓN SOBRE EL PROYECTO

1 – Datos del Proyecto

Título del Proyecto (en castellano): Deberá ingresar el título completo del proyecto (en castellano), indicando además el código asignado por la SCAyT.

Título del Proyecto (en inglés): Deberá ingresar el título completo del proyecto en inglés.

Descripción del Proyecto (en castellano): Deberá ingresar la descripción del Proyecto en castellano.

Descripción del Proyecto (en inglés): Deberá ingresar la descripción del Proyecto en inglés.

Palabras Claves descriptivas del Proyecto (en castellano): Deberá ingresar tres palabras claves descriptivas del Proyecto, en castellano.

Palabras Claves descriptivas del Proyecto (en inglés): Deberá ingresar tres palabras claves descriptivas del Proyecto, en inglés.

2- Datos del Director/a del Proyecto

Nombre y Apellido del Titular del Proyecto: Nombre completo y apellido del Titular del Proyecto.

Unidad Académica: Nombre de la Unidad Académica a la que pertenece el/la directora/a del Proyecto.

Teléfono oficial de contacto: Número de teléfono de la oficina/laboratorio/Institución del Director/a del Proyecto, donde pueda ser contactado, incluyendo número de área/país (ej: Para Santa Fe: + 54 9 342 4999-9999).

Teléfono móvil de contacto: Número de teléfono móvil del director/ar del Proyecto, donde pueda ser contactado, incluyendo número de área/país.

E-mail del Director/a del Proyecto: Correo electrónico de contacto del Director/a del Proyecto.

DATOS RESULTANTES DE LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

Describa la toma de muestras/datos a realizar: Información descriptiva sobre la toma de muestras que resultarán en datos/conjuntos de datos. La descripción deberá incluir



información de contexto (lugar de toma de los datos; instrumentos, etc.)

Datos: ¿Existe alguna razón por la cual los datos declarados no deban ser puestos a disposición de la comunidad/ser de acceso público? Deberá marcar con una “X” la opción correcta. En caso de responder afirmativamente, deberá justificar debidamente, comprendiendo que sólo en casos de extrema excepcionalidad esta restricción de acceso a los datos resulta practicable/aceptable.

Período de Confidencialidad: Es el periodo durante el cual los datos no deberían ser publicados, contado a partir del momento de la toma de los mismos. El periodo máximo para la no publicación es de 5 (CINCO) años posteriores a su obtención. Luego de este periodo, los datos estarán disponibles para la comunidad/serán de acceso público.

Si Ud. considera que este tiempo es insuficiente, y necesita prorrogar el período de confidencialidad, indique sus motivos y la cantidad de años adicionales que considera necesarios.

Deberá indicar los años que considera necesario prorrogar el período de confidencialidad y explicar los motivos.