



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Detección del estrés metabólico en ovejas gestantes a
través del análisis de espectroscopia de infrarrojo medio de
la leche

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Ganadería de Precisión

AUTOR/A: Marín Gómez, Juan

Tutor/a: Martínez Álvaro, Marina

Cotutor/a externo: RAMON FERNANDEZ, MANUEL

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica
i del Medi Natural



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

DETECCIÓN DEL ESTRÉS METABÓLICO EN OVEJAS GESTANTES A TRAVÉS DEL ANÁLISIS POR ESPECTROSCOPIA MIR DE LA LECHE

Trabajo de Final de Máster
Máster en Ganadería de Precisión

Autor: Marín Gómez, Juan
Tutor académico: Martínez Álvaro, Marina
Tutor externo: Ramón Fernández, Manuel
Valencia. Julio-1/ 2023

Título: *Detección del estrés metabólico en ovejas gestantes a través del análisis por espectroscopía MIR de la leche*

Resumen: *El estrés metabólico en rumiantes presenta unos valores medios de diagnóstico clínicos del 10% aproximadamente y subclínicos del casi el 50%. Por norma general los casos de estrés metabólico no atendidos terminan por derivar en casos clínicos, llamados toxemia de gestación. La toxemia de gestación tiene un índice de mortalidad alto, tanto de las madres como de las crías. Los inicios de esta patología suelen empezar a la mitad de la gestación, pero se acentúan cuando tan solo faltan seis semanas para el parto.*

Cuando se alcanza un diagnóstico claro normalmente el tratamiento ya no es rentable, lo ideal es atajar el problema con buen manejo alimenticio semanas atrás.

Esta tesis tiene dos objetivos. El primero es identificar biomarcadores en sangre de movilización de reservas o estrés metabólico en ovejas gestantes, primíparas y multíparas. El segundo objetivo explorar el posible potencial del uso de tecnología MIR en muestras de leche, comúnmente recogida durante los controles lecheros, para predecir dichos biomarcadores.

Los datos de metabolitos en sangre se tomaron unas semanas antes del parto y los datos del MIR de la leche se tomaron al principio de la lactación. El grupo experimental estaba compuesto por 181 ovejas raza Manchega, destinadas a leche, había 93 ovejas multíparas y 88 primíparas y los partos se repartieron entre el último trimestre de 2017 y el primer trimestre de 2018. Se nos informó que ningún animal había sufrido estrés metabólico a nivel clínico.

De las muestras de sangre se extrajeron las concentraciones de los metabolitos escogidos: glucosa, β -hidroxibutirato, NEFA, T3, insulina y leptina. También se registraron las condiciones corporales de los animales con el método de palpación (valoración 1 a 5).

Por otro lado, se tomaron muestras de leche de cada animal y se llevaron a analizar para obtener su espectro MIR.

Los ovejas multíparas y primíparas mostraron diferencias en la concentración de metabolitos en sangre, particularmente en T3, β -hidroxibutirato y glucosa, que fueron mayores en glucosa y T3 en primíparas y β -hidroxibutirato en multíparas. Ajustando un modelo PLS-DA usando los metabolitos como predictores, se consiguió discriminar entre multíparas y primíparas con un error de clasificación del 35% en validación cruzada. Los metabolitos que más peso tienen en la componente son el T3, el β -hidroxibutirato y la glucosa.

Se ajustaron 3 modelos PLS para intentar predecir estos 3 metabolitos en sangre usando el espectro MIR de la leche como predictor. La glucosa mostro los mejores resultados, con una predicción del 30,7% y de 25,2% en validación cruzada. Sin embargo, el modelo PLS, que tenía una predicción del 26,4% y 32,3% para T3 y β -hidroxibutirato, solo mostró una capacidad de predicción en validación cruzada de 2,8% para T3 y 1,3% para β -hidroxibutirato, probablemente debido a un sobre ajuste generado por la falta de datos

Se puede concluir que, tras haber diferencias significativas entre diferentes metabolitos para primíparas y multíparas, si se podría llegar a discernir entre estos dos grupos, pero no se podrían hacer buenas predicciones de los metabolitos a partir de los valores MIR dado que no tenemos un modelo que ajuste bien.

Palabras clave: *Oveja lechera, toxemia de gestación, ganadería de precisión, metabolitos, T3, β -hidroxibutirato, glucosa, MIR.*

Title: *Detection of metabolic stress in pregnant sheep through MIR milk spectroscopy analysis*

Abstract: *Metabolic stress in ruminants presents average clinical diagnostic values of approximately 10% and subclinical values of nearly 50%. Generally, untreated cases of metabolic stress lead to clinical cases, known as pregnancy toxemia. Pregnancy toxemia has a high mortality rate for both mothers and lambs. The onset of this condition usually occurs in the middle of gestation but intensifies when there are only six weeks left until parturition.*

By the time a clear diagnosis is reached, treatment is often no longer cost-effective. Ideally, the problem should be addressed through proper nutritional management weeks in advance. This thesis has two objectives. The first is to identify blood biomarkers for mobilization of reserves or metabolic stress in pregnant sheep, both primiparous and multiparous. The second objective is to explore the potential use of MIR technology on milk samples, commonly collected during milk controls, to predict these biomarkers.

Blood metabolite data were collected a few weeks before parturition, while MIR milk data were collected at the beginning of lactation. The experimental group consisted of 181 Manchega breed sheep destined for milk production, including 93 multiparous and 88 primiparous sheep. The births occurred between the last quarter of 2017 and the first quarter of 2018. We were informed that none of the animals had experienced clinical metabolic stress.

Concentrations of selected metabolites, including glucose, β -hydroxybutyrate, NEFA, T3, insulin, and leptin, were extracted from blood samples. The animals' body conditions were also recorded using palpation (rating from 1 to 5). Additionally, milk samples were taken from each animal and analyzed to obtain their MIR spectra.

Multiparous and primiparous sheep showed differences in blood metabolite concentrations, particularly in T3, β -hydroxybutyrate, and glucose, which were higher in glucose and T3 for primiparous sheep and β -hydroxybutyrate for multiparous sheep. By adjusting a PLS-DA model using the metabolites as predictors, discrimination between multiparous and primiparous sheep was achieved with a cross-validated classification error of 35%. The metabolites with the most weight in the component were T3, β -hydroxybutyrate, and glucose.

Three PLS models were adjusted to try to predict these three blood metabolites using MIR milk spectra as predictors. Glucose showed the best results, with a prediction of 30.7% and 25.2% in cross-validation. However, the PLS model, which had a prediction of 26.4% and 32.3% for T3 and β -hydroxybutyrate, respectively, only showed a cross-validated prediction capacity of 2.8% for T3 and 1.3% for β -hydroxybutyrate, likely due to overfitting caused by a lack of data.

In conclusion, although significant differences in metabolites between primiparous and multiparous ewes were observed, accurate predictions of metabolites based on MIR values could not be made due to the lack of a well-fitting model.

Keywords: *Dairy sheep, pregnancy toxemia, precision livestock farming, metabolites, T3, β -hydroxybutyrate, glucose, MIR.*

Títol: *Detecció de l'estrès metabòlic en ovelles gestants a través de l'anàlisi per espectroscòpia MIR de la llet*

Resum: *L'estrès metabòlic en remugants presenta uns valors mitjans de diagnòstic clínics del 10% aproximadament i subclínic del gairebé el 50%. Per norma general els casos estrès metabòlic no atesos acaben per derivar en casos clínics, anomenats toxèmia de gestació. La toxèmia de gestació té un índex de mortalitat alt, tant de les mares com de les cries. Els inicis d'aquesta patologia solen començar a la meitat de la gestació, però s'accentuen quan tan sols falten sis setmanes per al part.*

Quan s'aconsegueix un diagnòstic clar normalment el tractament ja no és rendible, l'ideal és atallar el problema amb bon maneig alimentós setmanes enrere. Aquesta tesi té dos objectius. El primer és identificar biomarcadors en sang de mobilització de reserves o estrès metabòlic en ovelles gestants, primíparas i múltipares. El segon objectiu explorar el possible potencial de l'ús de tecnologia MIR en mostres de llet, comunament recollida durant els controls lleters, per a predir aquests biomarcadors.

Les dades de metabòlits en sang es van prendre unes setmanes abans del part i les dades del MIR de la llet es van prendre al principi de la lactació. El grup experimental estava compost per 181 ovelles raça Manxega, destinades a llet, hi havia 93 ovelles múltipares i 88 primíparas i els parts es van repartir entre l'últim trimestre de 2017 i el primer trimestre de 2018. Se'ns va informar que cap animal havia sofert estrès metabòlic a nivell clínic.

De les mostres de sang es van extreure les concentracions dels metabòlits triats: glucosa, β -hidroxibutirat, NEFA, T3, insulina i leptina. També es van registrar les condicions corporals dels animals amb el mètode de palpació (valoració 1 a 5). D'altra banda, es van prendre mostres de llet de cada animal i es van emportar a analitzar per a obtenir el seu espectre MIR.

Els ovelles múltipares i primíparas van mostrar diferències en la concentració de metabòlits en sang, particularment en T3, β -hidroxibutirat i glucosa, que van ser majors en glucosa i T3 en primíparas i β -hidroxibutirat en múltipares. Ajustant un model PLS-DA usant els metabòlits com a predictors, es va aconseguir discriminar entre múltipares i primíparas amb un error de classificació del 35% en validació creuada. Els metabòlits que més pes tenen en la component són el T3, el β -hidroxibutirat i la glucosa.

Es van ajustar 3 models PLS per a intentar predir aquests 3 metabòlits en sang usant l'espectre MIR de la llet com a predictor. La glucosa va mostrar els millors resultats, amb una predicció del 30,7% i de 25,2% en validació creuada. No obstant això, el model PLS, que tenia una predicció del 26,4% i 32,3% per a T3 i β -hidroxibutirat, només va mostrar una capacitat de predicció en validació creuada de 2,8% per a T3 i 1,3% per a β -hidroxibutirat, probablement a causa d'un sobre ajusti generat per la falta de dades.

Es pot concloure que, després d'haver-hi diferències significatives entre diferents metabòlits per a primíparas i múltipares, si es podria arribar a discernir entre aquests dos grups, però no es podrien fer bones prediccions dels metabòlits a partir dels valors MIR degut a que no tenim un model que ajusti bé.

Paraules clau: *Ovella lletera, toxèmia de gestació, ramaderia de precisió, metabòlits, β -hidroxibutirat, glucosa, MIR.*

Agradecimientos

Para alcanzar la realización de este proyecto debo agradecer los datos cedidos por Manuel Ramón, investigador en Instituto Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario y Forestal (IRIAF) de Castilla-La Mancha.

En cuanto a lo que el proyecto comporta, debo agradecer de forma especial la ayuda, ánimo y fe de mi tutora Marina Martínez-Álvaro por todo su tiempo y dedicación a pesar de su ilusionante proyecto que tiene entre manos y próximamente ese proyecto se volverá su preocupación principal. Solo puedo desearle lo mejor y que sin duda la personita que traerá al mundo debería parecerse a ella en todo y sobre todo en su optimismo.

Por supuesto, también debo agradecer la ayuda ofrecida por Agos Zubiri con todas las manos que nos ha echado a la hora de solucionar problemas relacionados con el análisis de datos tan tediosos, en los que ella siempre sabía solucionar.

También quiero destacar todos los ánimos recibidos tanto por mis profesores y compañeros, una amalgama de personas que consiguen que mi experiencia personal en durante este año sea completamente satisfactoria.

Y sobre todo lo más importante, agradecer a mis personas más cercanas que comparten el día a día conmigo, ya sea en persona o a distancia, han sabido transmitirme su confianza y ánimos indiscutibles hacia mi criterio y mis proyectos que de vez en cuando se salen de la norma.

*Para los que ya se bajaron del tren,
Para los que se subieron al él,
Para los que permanecieron en él y
Para los que se subirán a él.*

Prefacio

Este trabajo de final de máster surge tras el descubrimiento sobre lo que realmente significa la ganadería de precisión y lo que realmente conlleva.

Los inicios del como he llegado hasta aquí se sustentan en una intención por la ganadería totalmente direccionada a la optimización de recursos, el bienestar animal, el respeto por el medio ambiente y respeto por las tradiciones de producción ganaderas o de zonas protegidas.

En mi caso tras finalizar el último año de agrónomos en modalidad SICUE en la Universitat Politècnica de Valencia, se me presentó la oportunidad de cursar la primera promoción del primer Máster en Ganadería de Precisión, algo que se orientaba totalmente a mis ideales, tecnología y optimización para hacer sostenible un modelo de producción que a veces no parece serlo tanto. Provenía del grado de ingeniería en ciencias agronómicas en la Universidad Politècnica de Catalunya.

Gracias a este máster y mi direccionamiento al sector del ovino de leche tras estar algún tiempo dedicándome a ese sector, decidí buscar un proyecto que, mediante herramientas de ganadería de precisión, fuese capaz de dar solución a problemas reales, presentes en el día a día de las explotaciones. Se trataba de abordar un problema que generase reducción de rentabilidad y que ocasionara malestar en animales.

Gracias a Fernando Estellés, el cual me facilitó el contacto con Manuel Ramón, cotutor externo del proyecto. Manuel nos facilitó el material y pudimos ponernos a trabajar.

Desde hace muchos años he querido introducirme en el lenguaje de programación dado su evidente potencial. Evidentemente este gusto por la programación, este atrevimiento y humilde conocimiento no vienen solos, sino que llegan gracias a las dos profesionales que más me han marcado en este máster, Marina Martínez-Álvaro, mi tutora del proyecto y Noelia Ibáñez. Gracias a ellas he aprendido lo básico y me han introducido un mundo nuevo de posibilidades, desbloqueando otra parte de mi conocimiento y mostrándome tanto su potencial como el de ellas mismas, que me han demostrado lo lejos que llegan y el gran recorrido que les queda por recorrer. También debo mencionar a Agos Zubiri, la persona que siempre estaba a nuestro lado para echarnos una mano cuando teníamos algún problema con R.

La realización de este proyecto ha sido realizada también durante las prácticas universitarias del máster, estas las realicé en una granja de ovino de unas cinco mil ovejas, donde el problema a tratar en este proyecto estaba a la orden del día y este hecho confirmo para mí la importancia de solucionar o facilitar un diagnóstico de una forma más fácil y anticipada.

Índice

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	<i>Factores que afectan a la movilización de reservas en ovejas reproductoras</i>	1
1.2.	<i>Variación de metabolitos en sangre según la etapa reproductiva ovejas y tamaño de camada</i>	
1.2.1.	Biomarcadores en sangre del estado metabólico.....	2
1.2.1.1.	T3.....	2
1.2.1.2.	NEFA's y β -hidroxibutirato.....	3
1.2.1.3.	Leptina.....	4
1.3.	<i>Problemas derivados del estrés metabólico</i>	4
1.4.	<i>Ventajas de tener indicadores de estrés metabólico</i>	5
2.	OBJETIVOS.....	6
3.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	6
3.1.	<i>Grupo experimental</i>	6
3.2.	<i>Dietas de los animales</i>	6
3.3.	<i>Recogida de datos</i>	7
3.3.1.	Recogida de datos de condición corporal.....	7
3.3.2.	Toma de muestras MIR y de metabolitos.....	7
3.4.	<i>Cálculos y análisis estadístico</i>	7
3.4.1.	Pretratamiento de datos.....	8
3.4.2.	Modelos univariantes.....	8
3.4.3.	Modelos multivariantes.....	8
4.	RESULTADOS.....	9
4.1.	<i>Diferencias entre multíparas y primíparas en concentración de metabolitos en plasma</i>	9
4.1.1.	Diferencias entre fecha de parto.....	9
4.2.	<i>Resultados del análisis multivariante</i>	10
4.2.1.	Capacidad de los metabolitos en sangre para discriminar entre primíparas o multíparas usando PLS-DA.....	10
4.2.2.	Predicción de la concentración de T3, Glucosa y β -hidroxibutirato en plasma a través del espectro MIR de la leche.....	12
4.2.2.1.	Glucosa.....	13
4.2.2.2.	B-hidroxibutirato.....	15
4.2.2.3.	T3.....	17
5.	DISCUSIÓN.....	20
6.	CONCLUSIONES.....	22
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	22



Índice de figuras

Figura 1 Gráfico de clasificación de tasa de error en función del número de componentes utilizados.	10
Figura 2 Distribución de los dos clusters de orden de parto en el DA-PLS.	11
Figura 3 Contribución de cada variable a la componente 1.....	12
Figura 4 Media del error predicho en el modelo glucosa en función del número de componentes utilizadas.	13
Figura 5 Diagrama de cargas de las bandas MIR más influyentes en la componente que define la glucosa.....	14
Figura 6 Media del error predicho en el modelo β -hidroxibutirato en función del número de componentes utilizadas.	15
Figura 7 Diagrama de cargas de las bandas MIR más influyentes en la componente 1 que define el β -hidroxibutirato.	16
Figura 8 Diagrama de cargas de las bandas MIR más influyentes en la componente 2 que define el β -hidroxibutirato.	16
Figura 9 Media del error predicho en el modelo T3 en función del número de componentes utilizadas.	18
Figura 10 Diagrama de cargas de las bandas MIR más influyentes en la componente 1 que define el T3.....	18
Figura 11 Diagrama de cargas de las bandas MIR más influyentes en la componente 2 que define el T3.....	19

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Diferencias de metabolitos en función del orden de parto (Primíparas/Múltiparas).....	9
Tabla 2 Diferencias de metabolitos en función de la fecha del parto (2017/2018).	10
Tabla 3 Resultados del test de validación cruzada (CV) del modelo PLS-DA prediciendo orden de parto.....	11
Tabla 4 Resultados de los modelos PLS, ajuste y predicción de los diferentes metabolitos escogidos.....	12
Tabla 5 Cargas en la componente 1 de las bandas MIR para predecir la glucosa.	14
Tabla 6 Cargas en las componentes 1 y 2 de las bandas MIR para predecir el β -hidroxibutirato.	17
Tabla 7 Cargas en las componentes 1 y 2 de las bandas MIR para predecir el T3.....	19

Índice de abreviaturas

NEFA (Ácidos grasos no esterificados)
T3 (Hormona tiroidea Triyodotironina)
LSMEANS (Media por mínimos cuadrados)
PLS-DA (Análisis Discriminate Mínimos Cuadrados Parciales)
PLS (Mínimos Cuadrados Parciales)
CC (Condición corporal)
MIR (Infrarrojo medio)

1. Introducción

1.1. Factores que afectan a la movilización de reservas en ovejas reproductoras

La cabaña ganadera ovina dedicada a leche transita por diferentes etapas metabólicas a lo largo de su vida, desde las particularidades del crecimiento fetal, el crecimiento tras el parto, la fase de gestación, la fase de amamantamiento, o la fase de secado; y cada una de estas etapas tiene unos requerimientos metabólicos diferentes entre sí (Piccione et al., 2009). Los cambios endógenos como la ingesta, la reproducción o incluso el crecimiento de la lana, tienen efectos en el entorno metabólico, dado que este responde para compensar los diferentes estados fisiológicos de los animales y las necesidades que requieren ser atendidas. Los cambios exógenos, como el clima, también generan alteraciones metabólicas (Todini, 2007). Las hormonas tiroideas, implicadas en el metabolismo, son las principales estimuladoras endocrinas de la termogénesis que ayudan a regular la temperatura del organismo cuando se producen estos cambios (Silva, 2005).

Por otro lado, la calidad y cantidad de los alimentos consumidos también son factores exógenos que influyen en las concentraciones de hormonas tiroideas plasmáticas. De hecho, los niveles de estas hormonas en sangre se pueden considerar buenos indicadores del estado nutricional de los animales (Dauncey, 1990; Riis & Madsen, 1985). Se debe tener muy en cuenta que las concentraciones de hormonas tiroideas se pueden correlacionar más con el consumo de alimento que el estado adiposo del animal (Caldeira et al., 2007a, 2007b; McCann et al., 1992).

Por otro lado, la edad de los animales es otro factor que podría influenciar en la capacidad de movilización de reservas. Generalmente se espera que ovejas jóvenes no tengan tanta capacidad para afrontar la desnutrición durante la gestación respecto a las maduras, dado que suelen tener las reservas corporales limitadas y todavía están en crecimiento (Ratray, 1986).

1.2. Variación de metabolitos en sangre según la etapa reproductiva ovejas y tamaño de camada

Existen diferentes etapas maternas que pueden afectar mucho a los metabolitos indicadores de estrés metabólico en ovejas y a sus crías. Por ejemplo, durante la gestación los animales suelen mostrar cierta resistencia a la insulina y esto se puede relacionar con concentraciones altas de NEFA's, lo que indica una disminución de la capacidad de la insulina para reducir o detener la lipólisis (Sivan et al., 1999). Por otro lado, se ha demostrado que existen diferencias entre ovejas múltiparas y ovejas primíparas: los niveles de glucosa postparto son mayores en múltiparas;

mientras que las concentraciones de cortisol plasmático son mayores en el caso de las primíparas (J. Pesántez-Pacheco et al., 2019). En otros estudios en los que el grupo experimental se componía de ovejas reproductoras en crecimiento y maduras, se pudo comprobar que había diferencias en algunos metabolitos como el β -hidroxibutirato y la glucosa.

Además, se observó que el nivel de glucemia en sangre decrece y las cantidades de β -hidroxibutirato y NEFA crece conforme aumenta el número de fetos (Hu et al., 1990). Además, se ha observado que los niveles de T3 y T4 en embarazos de gemelos en cabras a final de la gestación son menores que en casos de ovejas gestantes con una sola cría, hay diferencias hormonales entre gestaciones de una cría o más de una (Yildiz et al., 2005).

En cuanto a ovejas con partos dobles, se ha observado que, a final de gestación, cuando el balance energético es acentuadamente negativo y sufren de hipoglucemia, se ha considerado que este bajo nivel de glucosa va acompañado de una alteración en las respuestas metabólicas del organismo (G. Rossi et al., 1993).

1.2.1. Biomarcadores en sangre del estado metabólico

Para poder estimar el estado metabólico de los animales y así poder actuar en consecuencia se requiere de indicadores o biomarcadores metabólicos fiables que cuya concentración esté asociada a los procesos por los que están pasando.

La literatura sugiere que la glucosa es uno de estos marcadores. Al final de la gestación en ovejas preñadas con dos crías, se ha observado que el útero tiene una gran captación de glucosa, unido a una reducción en la síntesis materna de glucosa, generan un déficit en este metabolito y por tanto desbalance metabólico (Schlumbohm & Harmeyer, 2008).

1.2.1.1. T3

Otro de los indicadores de interés sobre el estado metabólico de los animales son las concentraciones circulantes de hormonas tiroideas medidas en sangre, como el T3, ya que responden a cambios en la actividad de la glándula tiroidea (Todini, 2007). Por norma general las hormonas tiroideas actúan sobre muchos tejidos diferentes, normalmente para aumentar el metabolismo basal y así hacer disponible la glucosa para las células, estimular la generación de proteínas, aumentar la metabolización de lípidos y otras funciones cardíacas y neurales (Capen & Martin, 1989). El T3 es una hormona tiroidea biológicamente activa, pasa de T4 a T3 mediante la desyodación del anillo externo que la compone originalmente. El T4 es la molécula no activa, pero en gran abundancia, llamada tetra-yodotironina o tiroxina. Ambos metabolitos T3 y T4 son derivados yodados del aminoácido tirosina (Utiger, 2001). Las proporciones de las hormonas asociadas derivadas del T4 son el T3 y el rT3, estas hormonas suelen encontrarse en la glándula

tiroides en un 90,4%, 8,8% y 0,7% respectivamente (Chopra et al., 1975). Se debe destacar que tanto el 99,5% y el 99,9% de T3 y T4 en ovejas adultas circulan en sangre unidos a otras proteínas plasmáticas (Chopra et al., 1975). La unión entre estas hormonas a proteínas séricas permite su fácil disposición, minimizando los efectos de la reducción de la secreción tiroidea (Bartalena, 1990; Utiger, 2001). En cabras se ha observado que los niveles de T3 y T4 en plasma disminuyen antes del estro y el apareamiento; aumentan a mediados del embarazo y vuelven a reducirse en la segunda mitad del embarazo, muy probablemente debido a un balance energético negativo (Todini et al., 2007). Esta observación sugiere el T3 como buen indicador de movilización de reservas.

También se ha visto que el metabolito T3 puede estimular directamente el consumo de alimento a través del hipotálamo (Kong et al., 2004). De hecho, en ovejas adultas las concentraciones de T3 disminuyen si hay una privación de energía y la concentración de estos mismos metabolitos aumenta si hay una nutrición adecuada o por encima. Se considera que las concentraciones plasmáticas de T3 están correlacionadas con los desbalances de nitrógeno y de energía (Blum et al., 1980). En carneros se observó que las concentraciones de T3 en plasma eran mayores cuando consumían altas cantidades de energía y proteína (Zhang et al., 2005).

1.2.1.2. NEFA's y β -hidroxibutirato

Otro indicador que habla sobre el balance energético son el β -hidroxibutirato y los NEFA's. En ovino, se observó que un ayuno prolongado durante la gestación aumentó la concentración de β -hidroxibutirato en sangre (Harmeyer & Schlumbohm, 2006), que es el principal cuerpo cetónico en ovejas, siendo de alrededor del 70-90 % del total de cuerpos cetónicos (Brockman & Laarveld, 1985). Este aumento también se observó en ovejas secas, aunque en menor medida (Harmeyer & Schlumbohm, 2006).

En cabras, se ha comprobado que altas concentraciones de NEFA reflejan la movilización de grasa en cabras lactantes, sobre todo si existe un balance energético negativo (Dunshea et al., 1989). Se ha visto que los valores altos de NEFA responden a un alto nivel de catabolización de lípidos y este proceso suele aumentar cuando los niveles de glucosa no son lo suficientemente adecuados.

Otro de los metabolitos que posiblemente habla sobre el estado metabólico de los animales es la insulina, dadas las diferencias que se han encontrado a finales de gestación y postparto entre vacas primíparas y múltiparas; Swali & Wathes, (2007) vio que en el parto el nivel de glucosa en múltiparas no bajaba tanto y la concentración de insulina bajaba. Y durante el postparto la

glucosa y la insulina se recuperaban antes y mejor en caso de multíparas en comparación con una lenta recuperación por parte de las primíparas (Swali & Wathes, 2007).

1.2.1.3. Leptina

Otro de los metabolitos implicados en la homeostasis energética es la leptina, hormona derivada del tejido adiposo, modula la ingesta de alimentos y gasto energético desde el hipotálamo. Generalmente es la encargada de mantener los niveles de grasa cercanos a un punto determinado (Ladyman, 2007). En vacas lecheras con déficit energético se observó un descenso de la leptina y aumento de NEFA's, por el contrario, si existe alta concentración de leptina en sangre habrá correlación positiva con glucosa e insulina plasmáticas (Block et al., 2001).

1.3. Problemas derivados del estrés metabólico

Se ha observado que se pueden satisfacer los requerimientos metabólicos que exige la gestación y la posterior lactancia mediante un buen manejo. Aun así, si un animal es altamente productivo, las fases de altos requerimientos energéticos pueden ir acompañados de un descenso en el peso y la condición corporal, probablemente debido al gran reto metabólico que supone afrontar estos periodos. También se ha visto que una oveja primípara tendrá un reto metabólico mucho más acentuado que una oveja multípara, tenga una o dos crías (J. Pesántez-Pacheco et al., 2019). Con la finalidad de aclarar las necesidades energéticas, cabe destacar que, durante la fase avanzada de la gestación, las necesidades energéticas de ovejas con un solo cordero son del 150% y en caso de ovejas con dos corderos es de 200% (Rook, 2000).

Normalmente se utiliza la puntuación de condición corporal y el peso para evaluar el estado nutricional y el nivel de engrasamiento de las ovejas y así saber de forma objetiva el estado durante las diferentes fases de la gestación y los estados por los que pasan (J. L. Pesántez-Pacheco et al., 2019). También se valora la posibilidad que en el caso de animales poco productivos y que no han sufrido cambios en el peso ni condición corporal tras el parto, como si lo hacen los altamente productivos, podría estar relacionado con el bajo rendimiento metabólico e incapacidad de rápida movilización de reservas (J. L. Pesántez-Pacheco et al., 2019). Esta baja capacidad de movilización podría ser la responsable de la baja productividad.

Uno de los principales problemas derivados de permanecer durante un tiempo prolongado en balance energético negativo durante las últimas semanas de preñez es la toxemia de gestación, un trastorno en la homeostasis energética (Harmeyer & Schlumbohm, 2006). Este desbalance metabólico genera altas tasas de mortalidad en ovejas con gemelos y aparece durante la última

fase de la gestación; una de las consecuencias a tener en cuenta para tratar de evitar toxemias es su alta mortalidad (Schlumbohm & Harmeyer, 2008).

Un desbalance energético a finales de la gestación ocasiona que se movilice una gran cantidad de NEFA, dado que no se puede recurrir a la cetogénesis alimentaria; estos NEFA son utilizados por el hígado en la vía de la cetogénesis, generando así muchos cuerpos cetónicos (Harmeyer & Schlumbohm, 2006). Hay estudios en los que el aumento del estrés metabólico a finales de gestación disparó los niveles de NEFA (+50% en conejas) mostrando un alto nivel de lipólisis debido a una movilización crítica de recursos corporales (Menchetti et al., 2015). A través de la utilización de los NEFA's se llega la generación del β -hidroxibutirato, este cuerpo cetónico se puede utilizar para dar energía a múltiples órganos, pero este cuerpo cetónico no es capaz de ser sintetizado ni por el cerebro, ni por el feto ni en la ubre para la obtención de glucosa (Heitmann et al., 1987; Michaux et al., 1981). Desembocar en este punto provoca una hipercetonemia, que a su vez suele tener un papel depresor del apetito dado que se elevan las concentraciones de D- β -hidroxibutirato (R. Rossi et al., 2000). Cabe destacar que la abundancia de cuerpos cetónicos en plasma genera una acidosis metabólica y aumentan las concentraciones de acetoacetato y este afecta directamente sobre el cerebro disminuyendo el consumo de oxígeno (Michaux et al., 1981).

Otro de los problemas que obliga a tener muy bien controlado el nivel de estrés metabólico de los animales es la fertilidad. Dado que si los animales sufren de manera prolongada un balance energético negativo suele reducir de forma notable la fertilidad (un -20% respecto a sin balance energético negativo en ratas) y este estrés también altera los valores de hormonas metabólicas y reproductivas (Brecchia et al., 2006). Se ha observado que las tasas de ovulación son menores en grupos con restricciones energéticas (Yıldırım et al., 2022).

1.4. Ventajas de tener indicadores de estrés metabólico

La prevalencia media de animales con toxemia del en granjas de cabras varía entre aproximadamente un 10% (Mongini & Van Saun, 2023). En el caso de ovejas, se ha llegado a encontrar un 20% del rebaño con alguno de los síntomas clínicos de toxemia de gestación (Mongini & Van Saun, 2023). A día de hoy las consecuencias de que algunos miembros de tu rebaño tengan toxemia puede acabar desembocando en la pérdida de estos animales y de sus crias (Mongini & Van Saun, 2023). Tener información sobre el estado metabólico del rebaño podría ayudar a reducir la infertilidad y así reducir los periodos vacíos o abiertos de nuestros animales.

Tener la información sobre el estado del estrés metabólico de los animales nos permite atajar los problemas y controlar muy bien cómo responder para poder darle una solución anticipada; es muy importante como gestionar el déficit energético, dado que si permitimos un consumo *ad libitum* podría ser contraproducente dado que podría llegar hasta el punto de generar una reducción de ingesta de materia seca en momentos cercanos al parto, derivando en un estrés metabólico más acentuado y observando así concentraciones plasmáticas de NEFA y β -hidroxibutirato más altas (Douglas et al., 2006). Tener estos animales con baja ingesta de materia seca en periodos cercanos al parto generaría una posible toxemia y un mal parto o mala salida en leche (Douglas et al., 2006).

2. Objetivos

Este trabajo tiene dos objetivos; el primero es identificar biomarcadores en sangre de que diferencien entre ovejas primíparas y múltiparas. El segundo objetivo explorar el posible potencial del uso de tecnología MIR en muestras de leche, comúnmente recogida durante los controles lecheros, para predecir dichos biomarcadores.

3. Material y métodos

3.1. Grupo experimental

El muestreo se realizó en la finca experimental “La Nava” perteneciente al Instituto Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario y Forestal (IRIAF) de Castilla-La Mancha y gestionada por la asociación de ganaderos de raza ovina Manchega, AGRAMA. En total se muestrearon 181 ovejas, 88 primíparas y 93 múltiparas. La recogida de datos se realizó en el primer mes posterior al parto. Las ovejas tenían entre 12 y 30 meses de edad en el momento del muestreo, y todas ellas recibieron el mismo manejo.

3.2. Dietas de los animales

La dieta de todo el grupo experimental era la misma. La dieta consistía en 2 kg de alimento, el 50% forraje de veza-avena y paja de cebada *ad libitum* y el otro 50% era “unifeed” sin forraje. La composición del “unifeed” fue para todos los animales la misma.

3.3. Recogida de datos

3.3.1. Recogida de datos de condición corporal

En las visitas a la granja, se midió la condición corporal de cada oveja palpando las apófisis espinosas y transversas de las vértebras lumbares con los dedos (escala de 1 a 5) (Russel, 1984).

3.3.2. Toma de muestras MIR y de metabolitos

Durante la visita a la granja también se recogió de cada animal una muestra individual de leche. Las muestras de leche se tomaron con un tubo de recogida de leche de 50 ml y se enviaron el mismo día refrigerados a 5°C al laboratorio interprofesional lácteo de Castilla-La Mancha (LILCAM), donde se almacenaron refrigeradas a 5°C y se analizaron al día siguiente (un plazo de 24 horas desde la recogida hasta el análisis). Se realizó el análisis cualitativo y se obtuvieron los espectros de infrarrojo medio (MIR) (MilkoScan™ 7 RM, MilkoScan™ FT+, Foss Electric, Hillerød, Dinamarca; Laboratorio Interprofesional Lácteo de Castilla-La Mancha, Talavera de la Reina, España), al MIR se le realizó la transformada de Fourier (Fourier-transform mid-infrared (FTIR)). Asimismo, se extrajo una muestra de sangre de cada oveja (tubos con K2-EDTA para su conservación) (BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.), las cuales fueron centrifugadas (1500 x g durante 15 minutos a 4 °C) para la extracción del plasma, congelándose a continuación en nitrógeno líquido el mismo día de recogida en la granja y almacenándose a -30 °C hasta su envío al laboratorio. En el laboratorio se realizó la determinación de los diferentes metabolitos mediante kit de laboratorio siguiendo instrucciones del fabricante, insulina mediante kit ELISA (Mercodia Ovine Insulin ELISA, Mercodia, AD Bioinstruments, Barcelona, España), glucosa mediante método de la hexoquinasa con analizador automático (Olympus AU400, Hamburgo, Alemania), los ácidos grasos no esterificados (NEFA) mediante método enzimático colorimétrico ACS-ACOD utilizando un kit comercial (Wako Chemicals, Neuss, Alemania), β -hidroxibutirato (BHB) utilizando un kit comercial mediante método enzimático cinético (Ranbut, Randox, Reino Unido); triyodotironina (T3) y leptina mediante los kits de fabricante.

3.4. Cálculos y análisis estadístico

Todos los cálculos estadísticos y modelos elaborados, fueron generados a partir de la herramienta RStudio, a través del lenguaje de programación R. El lenguaje y el software está destinado a la realización de cálculos y visualización.

3.4.1. Pretratamiento de datos

El primer paso que se realizó fue el de identificación de datos faltantes, no faltaba ningún dato del MIR, pero había catorce animales que no tenían datos de metabolitos.

El primer tratamiento fue el de escalado de los datos MIR, este consiste en restar la media y dividir por la desviación típica.

Se probaron también dos transformaciones más a los dos MIR una vez escalados: el cálculo de la primera y de la segunda derivada.

3.4.2. Modelos univariantes

Se estudiaron las LSMEANS y diferencias entre primíparas y multíparas para cada uno de los metabolitos ajustando un modelo lineal con la concentración del metabolito como variable dependiente, y los efectos fijos de orden de parto (primíparas y multíparas) y fecha de parto (2017 y 2018) como efectos fijos. Para realizar estos cálculos se utilizó el software RStudio (RStudio, 2020).

3.4.3. Modelos multivariantes

En primer lugar, se exploró la capacidad de los metabolitos en plasma y la condición corporal de los animales para discriminar entre multíparas y primíparas ajustando un modelo DA-PLS (Análisis Discriminante por Mínimos Cuadrados Parciales) con el paquete de R “mixOmics” (Lê Cao & Welham, 2021). El número de componentes del modelo se eligió a través de una validación cruzada usando la función `perf`, tal y como se describe en (Miller et al., 2023). El procedimiento de validación cruzada fue se realizó con 7 bloques, repetido 5 veces, y se eligió el número de componentes que minimizaba el error de clasificación. Los metabolitos con mayor capacidad discriminante fueron explorados a través de los gráficos de las cargas.

Una vez escogidos los metabolitos con mayor capacidad discriminante entre multíparas y primíparas, se exploró la posibilidad de predecir su concentración a través de los espectros MIR de la leche ajustando un PLS para cada metabolito, también usando el paquete “mixOmics”. El número de componentes se eligió por validación cruzada, con 4-folds y 5 repeticiones y se eligió el número de componentes que minimizaba el error de predicción medio. Se probó a predecir los metabolitos con los espectros MIR sometidos a tres transformaciones distintas: escalado, escalado + primera derivada, y escalado + segunda derivada.

4. Resultados

4.1. Diferencias entre multíparas y primíparas en concentración de metabolitos en plasma

La **Tabla 1** muestra los resultados de las diferencias entre los diferentes metabolitos en función de si las ovejas son primíparas o multíparas. Se muestra el resultado del LSMEANS, siendo la media calculada mediante mínimos cuadrados. En la columna colindante se encuentra el error estándar (SE) y en la inmediatamente siguiente la diferencia entre las variables categóricas (primíparas o multíparas).

Tabla 1 Diferencias de metabolitos en función del orden de parto (Primíparas/Multíparas).

Metabolito	Primíparas		Multíparas		Diferencia		
	LSM	SE	LSM	SE	OP	SE	P - valor
CC	3,040	0,038	3,097	0,039	-0,058	0,054	0,2855
Glucosa	73,049	0,657	69,596	0,695	3,453	0,939	0,0003*
β -hidroxibutirato	0,525	0,022	0,633	0,023	-0,109	0,031	0,0005*
NEFA	0,192	0,015	0,225	0,015	-0,033	0,021	0,1112
T3	2,983	0,065	2,710	0,069	0,273	0,093	0,0037*
Insulina	0,728	0,060	0,647	0,064	0,081	0,086	0,3483
Leptina	9,405	0,720	10,952	0,700	-1,547	1,001	0,1266

CC = puntuación de condición corporal; NEFA = Ácidos Grasos No Esterificados (Non-Esterified Fatty Acids); T3 = abreviatura del metabolito tiroideo T3; LSM = media calculada por mínimos cuadrados; SE = error estándar; OP = Diferencia entre orden de partos (LSM Primíparas - LSM Multíparas); [*] = Considerando que es significativo si P-valor \leq 0,05.

Multíparas y primíparas mostraron diferentes niveles en sangre de la glucosa, el β -hidroxibutirato y el metabolito T3 (P-value \leq 0.05, **Tabla 1**). Sin embargo, multíparas y primíparas no difirieron en su CC.

4.1.1. Diferencias entre fecha de parto

Aunque no es el objetivo de este trabajo, al corregir en el modelo por efecto año (último trimestre de 2017 o el primer trimestre de 2018), también obtuvimos las estimas de este efecto sobre la concentración de metabolitos (**Tabla 2**). Se observaron diferencias significativas en algunos de los metabolitos, destacando la glucosa, los NEFA y la insulina; y también en la condición corporal.

Tabla 2 Diferencias de metabolitos en función de la fecha del parto (2017/2018).

Metabolito	2017		2018		Diferencia		
	LSM	SE	LSM	SE	Año	SE	P - valor
CC	3,192	0,046	2,945	0,033	-0,247	0,057	2,33E-05*
Glucosa	66,184	0,798	76,461	0,572	10,277	0,990	1,03E-19*
B-hidroxibutirato	0,609	0,026	0,549	0,019	-0,060	0,033	0,0682
NEFA	0,272	0,018	0,145	0,013	-0,126	0,022	3,96E-08*
T3	2,932	0,079	2,761	0,056	-0,172	0,098	0,0806
Insulina	0,456	0,073	0,919	0,052	0,463	0,091	8,57E-07*
Leptina	8,531	0,765	11,826	0,659	3,295	1,012	0,0017*

CC = puntuación de condición corporal; NEFA = Ácidos Grasos No Esterificados (Non-Esterified Fatty Acids); T3 = abreviatura del metabolito tiroideo T3; LSM = media calculada por mínimos cuadrados; SE = error estándar; Año = Diferencia entre fecha de parto (LSM 2017- LSM 2018); [*] = Considerando que es significativo si P-valor \leq 0,05.

4.2. Resultados del análisis multivariante

4.2.1. Capacidad de los metabolitos en sangre para discriminar entre primíparas o múltiparas usando PLS-DA.

Para saber si hay variables que consigan discriminar entre la variable categórica de orden de parto (primíparas o múltiparas) se realiza un análisis multivariante tipo DA-PLS. La validación cruzada determinó que el mínimo error de clasificación estaba determinado por un modelo con un solo componente (**Figura 1**), para las tres distancias calculadas.

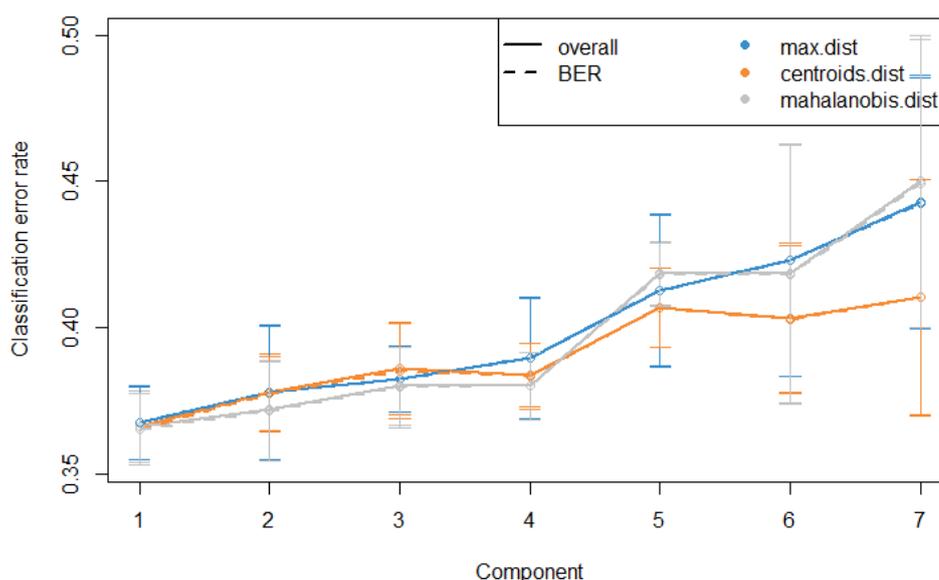


Figura 1 Gráfico de clasificación de tasa de error en función del número de componentes utilizados.

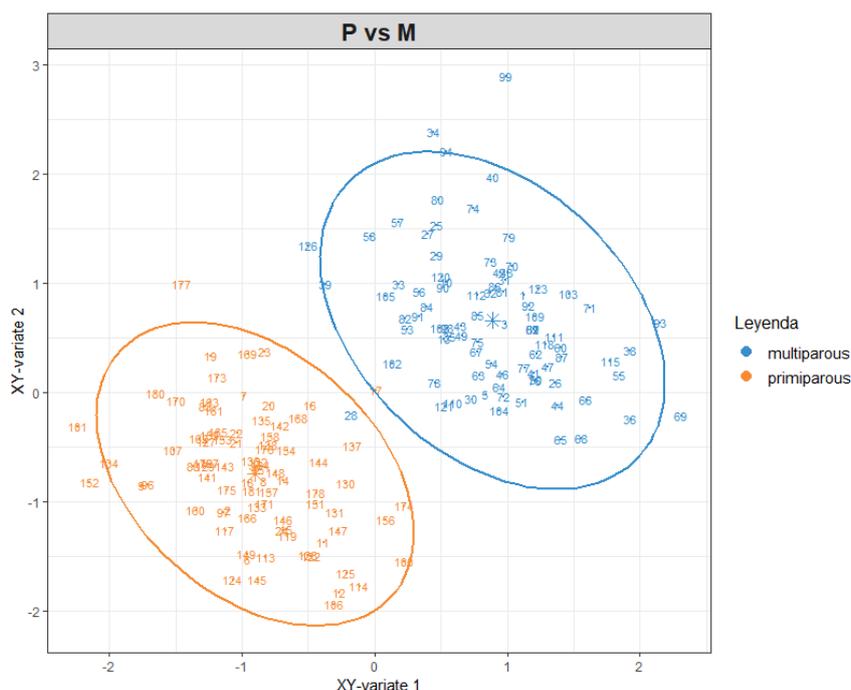


Figura 2 Distribución de los dos clusters de orden de parto en el DA-PLS.

El Score Plot o gráfico de individuos se muestra en la **Figura 2**. El gráfico, que se obtuvo con dos componentes por motivos de visualización, muestra una diferenciación entre clusters formados por primíparas y múltiparas. El modelo final con una sola componente mostró una tasa de error de clasificación en validación cruzada del $35,8 \pm 2,4\%$. El error de clasificación obtenido en cada una de las 5 repeticiones de la validación cruzada se muestra en la **Tabla 3**.

Tabla 3 Resultados del test de validación cruzada (CV) del modelo PLS-DA prediciendo orden de parto.

Clasificación	n° de Repetición					PROMEDIO	SD
	n° 1	n° 2	n° 3	n° 4	n° 5		
Verdadero	115	106	112	106	113		
Falso	57	66	60	66	59		
Miss Classif Rate	0,3314	0,3837	0,3488	0,3837	0,3430	0,3581	0,0242

Miss Classif Rate = tasa de error de clasificación; SD = desviación estándar; CV = cross-validation (test de validación cruzada).

La **Figura 3** muestra un gráfico de cargas, que representa la importancia de cada metabolito en la discriminación. Como se observa en la **Figura 3** la contribución a la primera componente está formada principalmente por el metabolito T3 y el metabolito β -hidroxibutirato, también interviene la glucosa. Cabe destacar que tanto la glucosa como el T3 son mayores en las primíparas, mientras que el β -hidroxibutirato tiene un papel opuesto a los anteriores y es mayor en la condición de ovejas múltiparas.

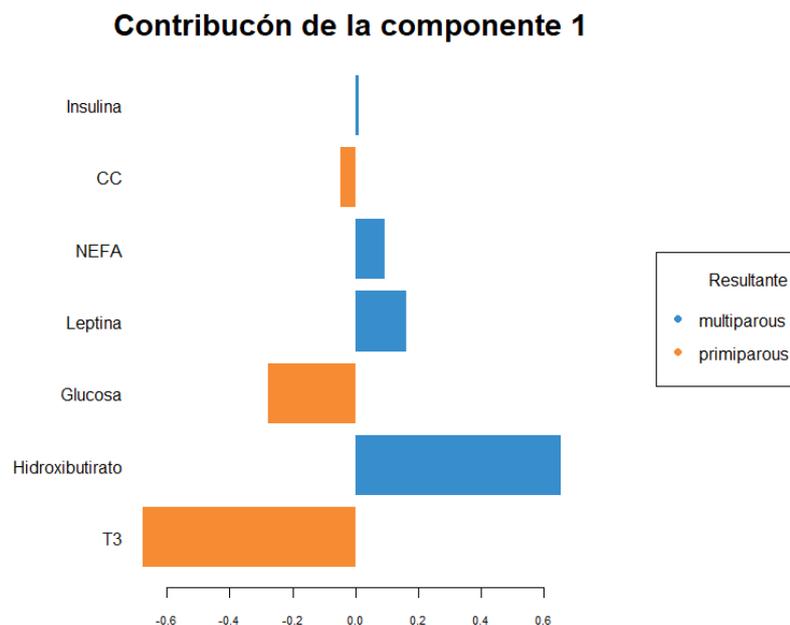


Figura 3 Contribución de cada variable a la componente 1.

4.2.2. Predicción de la concentración de T3, Glucosa y β -hidroxibutirato en plasma a través del espectro MIR de la leche.

Se realizó un modelo PLS con los datos de absorbancia de las bandas MIR obtenidos del análisis de la leche para tratar de predecir los diferentes metabolitos. Los valores de las diferentes bandas del MIR se implementaron en el modelo con tres tipos de transformaciones (escalado, escalado + primera derivada y escalado + segunda derivada) con tal de discernir entre las bandas que son capaces de explicar la variabilidad de los metabolitos.

En la **Tabla 4** se muestran los resultados obtenidos tras la elaboración del modelo PLS utilizando los datos MIR con las diferentes transformaciones para predecir los diferentes metabolitos. Los mejores resultados se obtuvieron con la transformación D2 de los espectros MIR para Glucosa y T3, y con la transformación D1 para el β -hidroxibutirato.

Tabla 4 Resultados de los modelos PLS, ajuste y predicción de los diferentes metabolitos escogidos.

Metabolito	Trat.	Ajuste del modelo				Predicción del modelo		
		n° C	R ²	Q ²	SD (\pm)	n° C	E.Q ²	SD (\pm)
Glucosa	SCAL	1	0,2539	0,2154	0,0092	1	0,2083	0,0200
	1D	1	0,2973	0,2443	0,0171	1	0,2434	0,0130
	2D	1	0,3068	0,2506	0,0149	1	0,2525	0,0075
B-hidroxibutirato	SCAL	2	0,1793	0,0105	0,0052	2	0,0064	0,0062
	1D	2	0,3234	0,0118	0,0035	2	0,0133	0,0020
	2D	2	0,3184	0,0113	0,0042	2	0,0106	0,0049

	SCAL	2	0,0697	0,0056	0,0038	2	0,0102	0,0120
T3	1D	2	0,2378	0,0238	0,0093	2	0,0282	0,0140
	2D	2	0,2637	0,0185	0,0022	2	0,0278	0,0099

Trat. = tratamiento de los datos MIR; SCAL = datos del MIR escalados; 1D = datos del MIR escalados y con la primera derivada; 2D = datos del MIR escalados y con la segunda derivada; n°C = número de componentes utilizadas para realizar el modelo; R² = tanto por uno del ajuste de los datos a la recta de regresión del modelo, las destacadas son las escogidas, las que ajustan mejor; Q² = tanto por uno del acierto en el ajuste del modelo; SD = desviación estándar; E.Q² = tanto por uno del éxito en la predicción del modelo.

En lo que respecta a la capacidad de predicción del modelo elaborado, se observó que tan solo en la glucosa se obtuvo una capacidad de predicción del metabolito aceptable, que en una base de datos externa (testing set) fue de en torno al 25%. En cuanto a β-hidroxibutirato y T3, se observó que el modelo mostró una capacidad de predicción moderada para las observaciones usadas para ajustar el modelo; pero sin embargo predice bastante mal muestras externas, probablemente debido a un sobreajuste del modelo.

4.2.2.1. Glucosa

Se muestran los resultados para el modelo PLS de predicción de la glucosa usando espectros MIR con la transformación D2. Tras la validación cruzada, se decidió utilizar tan solo una componente durante la optimización del modelo (**Figura 4**).

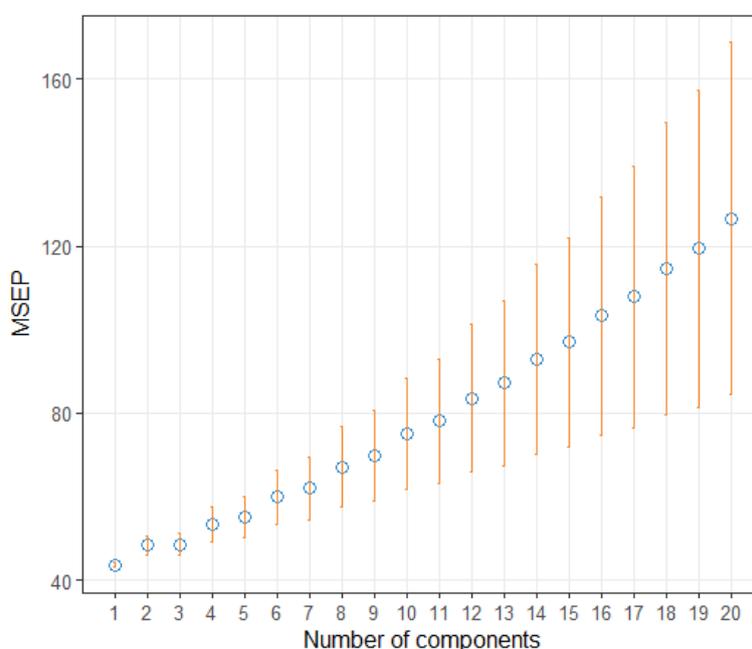


Figura 4 Media del error predicho en el modelo glucosa en función del número de componentes utilizadas.

Mediante la realización del PLS y optimización, determinando el uso de una sola componente, se extrajo la distribución de cargas para las diferentes bandas, mostrando las veinte más importantes como se muestra en la **Figura 5**.

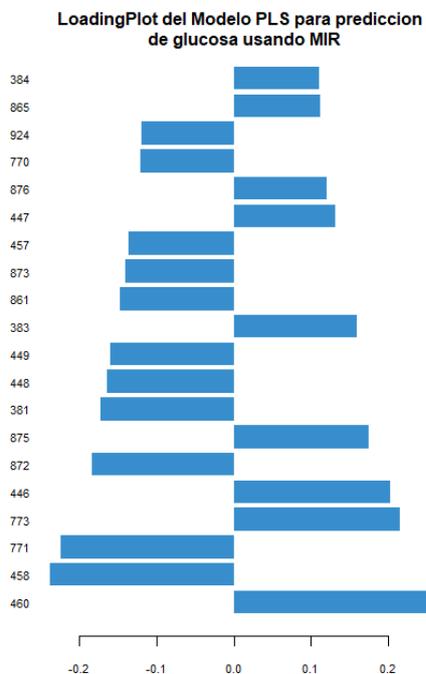


Figura 5 Diagrama de cargas de las bandas MIR más influyentes en la componente que define la glucosa.

Las veinte bandas más importantes para la componente están descritas en la **Tabla 5** con sus cargas correspondientes donde se observó que las bandas implicadas son: 381-384, 446-449, 457-460, 770-773, 861-865, 872-876, 924.

Tabla 5 Cargas en la componente 1 de las bandas MIR para predecir la glucosa.

Componente 1		
Bandas	C.Negativa	C.Positiva
460	-	0.263
458	0.238	-
771	0.224	-
773	-	0.215
446	-	0.203
872	0.184	-
875	-	0.175
381	0.173	-
448	0.164	-
449	0.160	-
383	-	0.159
861	0.148	-
873	0.140	-

457	0.137	-
447	-	0.131
876	-	0.121
770	0.120	-
924	0.120	-
865	-	0.112
384	-	0.110

4.2.2.2. B-hidroxibutirato

A continuación, se muestran los resultados del modelo PLS de predicción del β -hidroxibutirato usando espectros MIR con la transformación D1. Tras la validación cruzada, se decidió utilizar dos componentes durante la optimización del modelo (**Figura 6**).

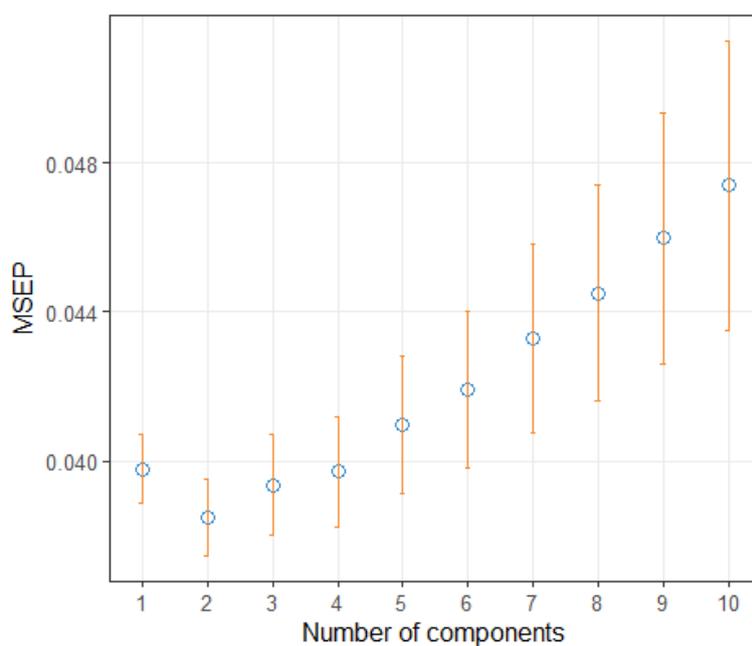


Figura 6 Media del error predicho en el modelo β -hidroxibutirato en función del número de componentes utilizadas.

Una vez se obtuvo el modelo se extrajeron los gráficos de las diferentes cargas para ambas componentes como se observa en la **Figura 7** y la **Figura 8**, donde se muestran las cargas y los diferentes sentidos (positivo o negativo).

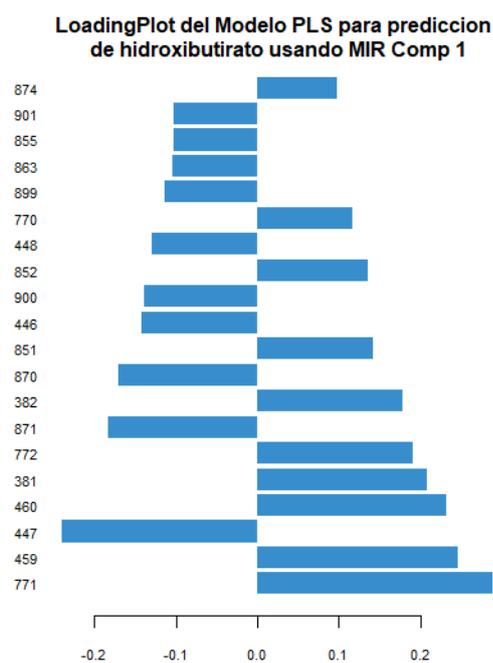


Figura 7 Diagrama de cargas de las bandas MIR más influyentes en la componente 1 que define el β -hidroxibutirato.

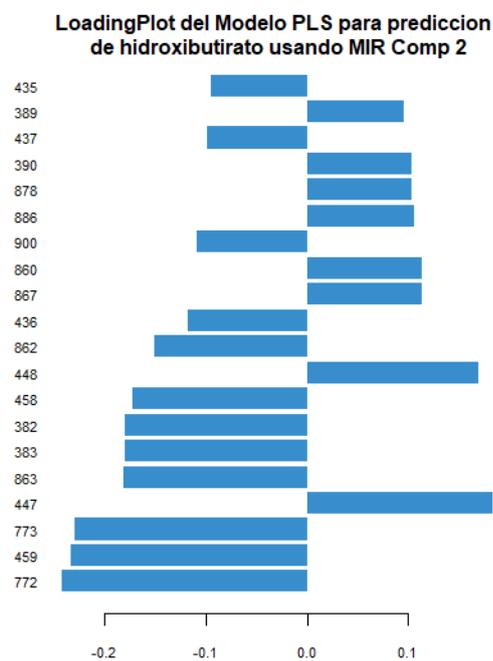


Figura 8 Diagrama de cargas de las bandas MIR más influyentes en la componente 2 que define el β -hidroxibutirato.

Las veinte bandas más importantes para cada una de las componentes están descritas en la **Tabla 6** con sus cargas correspondientes donde se observó que las bandas implicadas son: 381-383, 389-390, 435-437, 446-448, 458-460, 770-773, 851-855, 860-863, 867-878, 886, 899-901.

Tabla 6 Cargas en las componentes 1 y 2 de las bandas MIR para predecir el β -hidroxibutirato.

Componente 1			Componente 2		
Bandas	C.Negativa	C.Positiva	Bandas	C.Negativa	C.Positiva
771	-	0,289	772	0,242	-
459	-	0,247	459	0,233	-
447	0,240	-	773	0,230	-
460	-	0,232	447	-	0,183
381	-	0,209	863	0,181	-
772	-	0,191	383	0,180	-
871	0,184	-	382	0,180	-
382	-	0,178	458	0,172	-
870	0,170	-	448	-	0,169
851	-	0,143	862	0,150	-
446	0,142	-	436	0,117	-
900	0,139	-	867	-	0,113
852	-	0,136	860	-	0,113
448	0,129	-	900	0,109	-
770	-	0,117	886	-	0,105
899	0,114	-	878	-	0,103
863	0,105	-	390	-	0,103
855	0,103	-	437	0,099	-
901	0,102	-	389	-	0,096
874	-	0,097	435	0,094	-

4.2.2.3.T3

Se muestran los resultados para el modelo PLS de predicción de la glucosa usando espectros MIR con la transformación D2. Tras la validación cruzada, se decidió utilizar tan solo una componente durante la optimización del modelo (**Figura 4**).

Se muestran los resultados para el modelo PLS de predicción del T3 usando espectros MIR con la transformación D2. Tras la validación cruzada, se decidió utilizar dos componentes durante la optimización del modelo (**Figura 9**).

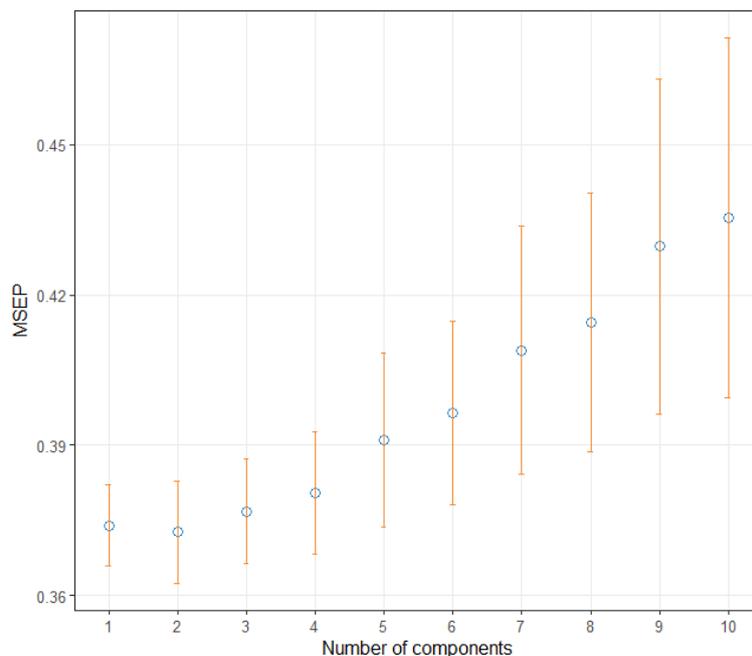


Figura 9 Media del error predicho en el modelo T3 en función del número de componentes utilizadas.

Tras la obtención del modelo se realizaron los diagramas de cargas tanto para la componente uno como para la componente dos, en estos diagramas se muestran las veinte bandas más importantes junto con su carga y sentido, se muestran en la **Figura 10** y en la **Figura 11**.

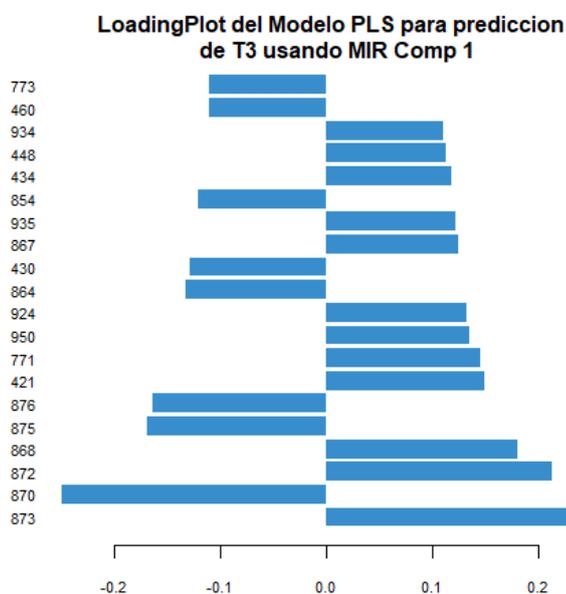


Figura 10 Diagrama de cargas de las bandas MIR más influyentes en la componente 1 que define el T3.

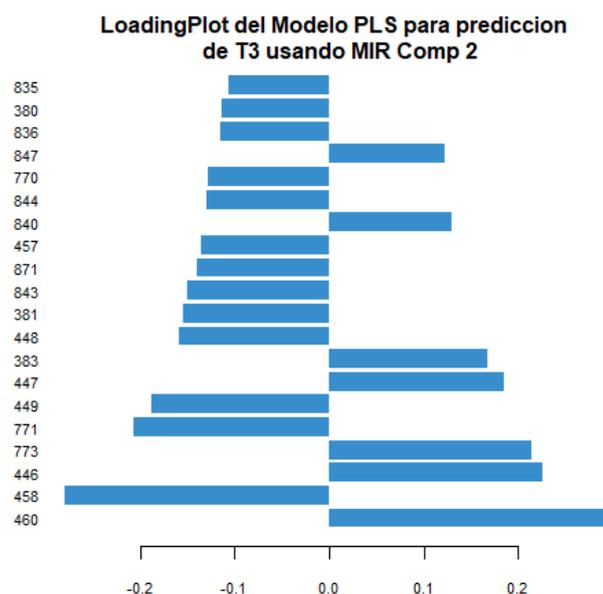


Figura 11 Diagrama de cargas de las bandas MIR más influyentes en la componente 2 que define el T3.

Las veinte bandas más importantes para cada una de las componentes están descritas en la **Tabla 7** con sus cargas y sentido correspondientes donde se observó que las bandas implicadas son: 380-383, 421, 430-434, 446-449, 457-460, 770-773, 835-836, 840-847, 854, 864-876, 924, 934-935, 950.

Tabla 7 Cargas en las componentes 1 y 2 de las bandas MIR para predecir el T3.

Componente 1			Componente 2		
Bandas	C.Negativa	C.Positiva	Bandas	C.Negativa	C.Positiva
873	-	0.266	460	-	0.299
870	0.249	-	458	0.280	-
872	-	0.213	446	-	0.226
868	-	0.180	773	-	0.215
875	0.168	-	771	0.207	-
876	0.163	-	449	0.189	-
421	-	0.149	447	-	0.186
771	-	0.146	383	-	0.167
950	-	0.135	448	0.160	-
924	-	0.132	381	0.154	-
864	0.132	-	843	0.150	-
430	0.128	-	871	0.141	-
867	-	0.124	457	0.136	-
935	-	0.122	840	-	0.130
854	0.120	-	844	0.129	-
434	-	0.119	770	0.129	-
448	-	0.114	847	-	0.123
934	-	0.111	836	0.115	-
460	0.110	-	380	0.113	-
773	0.110	-	835	0.106	-

5. Discusión

Tras obtener los datos de los metabolitos para cada orden de parto (primíparas o multíparas) se observa que los grupos muestran diferencias significativas en los metabolitos: glucosa, β -hidroxibutirato y T3. Además, estos metabolitos tienen potencial como biomarcadores para diferenciar entre ovejas de ambos grupos si se usan como predictores en un modelo PLS-DA, con un error en validación cruzada del 35%. Sin embargo, dados nuestros datos, no podemos decir que estos metabolitos puedan usarse como biomarcadores de estrés metabólico o movilización de reservas. Por un lado, los dos grupos no presentan diferencias en su condición corporal. La medida de condición corporal es una medida algo subjetiva, y además no encontramos apenas variación entre animales, en esta media (44 animales con CC de 2,5; 83 animales con CC de 3; 53 animales con CC de 3,5; 1 animal con CC de 4). Además, ninguno de los grupos se encuentra bajo un desbalance energético negativo o fase con cetosis, dado que los valores de glucosa y NEFA's están dentro de la normalidad (Hernández et al., 2020; Menchetti et al., 2015).

Podría ser interesante obtener valores de control lechero (e.j. kg de grasa en leche), que son valores más objetivos y nos podría permitir establecer una asociación entre estos metabolitos en sangre y el metabolismo lipídico de las ovejas.

Aun así, nuestros resultados muestran mayor glucosa y T3 en las primíparas, teniendo sentido que vayan en una misma dirección dada su correlación positiva (Capen & Martin, 1989). Por otro lado, el β -hidroxibutirato es mayor en las multíparas, estando en el mismo sentido que los NEFA's, aunque esto resulte no significativo y tenga una carga baja en el modelo DA-PLS. Estas diferencias entre grupos podrían deberse a múltiples factores, desde diferencias en edad, ingesta, hasta estado fisiológico de los animales no detectado con las mediciones de CC.

En la bibliografía, la toxemia se asocia a aumentos en NEFA's, lo que provoca un aumento en cuerpos cetónicos (β -hidroxibutirato) y descensos en valores de glucosa, insulina y T3 (Block et al., 2001; Blum et al., 1980; Harmeyer & Schlumbohm, 2006; Heitmann et al., 1987; Michaux et al., 1981). A pesar de no tener casos de toxemia en nuestro estudio, sí que observamos variaciones relacionadas NEFA's, β -hidroxibutirato y T3; por otro lado, también hay correlación positiva entre insulina y glucosa.

En estudios donde ovejas primíparas muestran mayor estrés metabólico que multíparas, se espera un descenso de T3 en el primer grupo, dado que no son maduras todavía (J. Pesántez-Pacheco et al., 2019). Cabe destacar que en nuestro estudio los niveles de β -hidroxibutirato (0,525 mmol/L para primíparas y 0,633 mmol/L para multíparas) están por encima de los valores

normales recogido en la literatura (0,30–0,38 mmol/L, (Hernández et al., 2020)), pero no hemos encontrado una justificación, dados nuestros datos.

En la corrección del modelo por el efecto año, en el que se tienen datos del último trimestre de 2017 y primer trimestre de 2018, hay significancia en: CC, glucosa, NEFA, insulina y leptina. Estas diferencias indican que las ovejas de 2017 mostraban posiblemente algo más de déficit en glucosa y niveles en el límite superior de NEFA, también acompañado de una condición corporal algo superior a época de parto 2018. Se ven diferencias en NEFA entre diferentes grupos de fecha de parto dado que tienen un balance energético diferente (3,19 en primíparas y 2,94 en múltiparas; $P \leq 0,05$), quizá un poco, pero esto aparece con balances energéticos bajos a final de gestación (Dunshea et al., 1989).

Nuestros modelos PLS para predecir los niveles en sangre de glucosa, T3 y β -hidroxibutirato a partir de datos MIR tienen una capacidad de predicción baja. En los tres metabolitos se obtuvieron valores de ajuste de entorno al 30% en el “training set”. Sin embargo, solo la glucosa mostró una capacidad de predicción similar en datos externos. Los modelos de T3 y β -hidroxibutirato no mostraron estos resultados, probablemente debido a un sobre ajuste en la realización del modelo. Las causas de este sobre ajuste se podrían atribuir a un número insuficiente de datos, o una falta de correlación entre los espectros de la leche y estos metabolitos. También cabe destacar que un mayor rango de variación en estos metabolitos y en el estrés metabólico de los animales podría mejorar la capacidad de predicción del modelo.

Estos resultados no nos permiten utilizar este modelo para poder definir concentraciones de metabolitos en sangre, pero si sería probablemente capaz de discernir en caso de valores muy extremos y nos podría llegar a permitir saber si un animal está en déficit energético. Dado que requeriría de valores extremos, esto iría de la mano de un diagnóstico clínico, situación de difícil solución y excesivamente costosa.

Nuestros valores son bajos en comparación con otros estudios en los que trataban de predecir β -hidroxibutirato y NEFA en sangre a través de la leche (van der Drift et al., 2012), donde contaban con casos de animales con y sin toxemia.

En la actualidad, en el sector ovino, no hay muchos estudios que hayan investigado el estrés metabólico en ovejas en comparación con otras especies más extendidas como el vacuno; aunque sin embargo, esto es causa de grandes pérdidas para el sector y sería conveniente seguir investigando sobre posibles métodos de prevención y detección de estrés metabólico que se nutra de nuevos estudios y ensayos todavía es reducida, no se ha hecho tanto hincapié ni tiene un gran porcentaje dentro de los ensayos que se tienen en cuenta (Hernández et al., 2020).

6. Conclusiones

Para concluir, se puede decir que el metabolito T3, el β -hidroxibutirato y la glucosa podrían ser buenos indicadores en sangre para diferenciar si un animal sufre de estrés metabólico dado el ensayo realizado en el que se tienen datos de ovejas primíparas y multíparas, y suponiendo que las primeras por normal general tienen mayor probabilidad de sufrir estrés metabólico debido a su todavía alta necesidad de nutrientes para completar su crecimiento. Sin embargo, esto no se ha medido en este grupo de animales y se debería confirmar

Por otro lado, tras la realización de varios modelos PLS para saber si es posible predecir los metabolitos anteriores en sangre usando el espectro MIR de la leche, se puede decir que disponemos de una muestra muy pequeña y con ausencia de toxemias clínicas, complicando así la elaboración del modelo. Conseguimos un ajuste aproximado del 30% pero una predicción del 1-2% en los casos de β -hidroxibutirato y T3 y una predicción del 25% para la glucosa.

7. Bibliografía

- Bartalena, L. (1990). Recent Achievements in Studies on Thyroid Hormone-Binding Proteins*. *Endocrine Reviews*, 11(1), 47–64. <https://doi.org/10.1210/edrv-11-1-47>
- Block, S. S., Butler, W. R., Ehrhardt, R. A., Bell, A. W., Van Amburgh, M. E., & Boisclair, Y. R. (2001). Decreased concentration of plasma leptin in periparturient dairy cows is caused by negative energy balance. *Journal of Endocrinology*, 171(2), 339–348.
- Blum, J. W., Gingsins, M., Vitins, P., & Bickel, H. (1980). Thyroid hormone levels related to energy and nitrogen balance during weight loss and regain in adult sheep. *European Journal of Endocrinology*, 93(4), 440–447.
- Brecchia, G., Bonanno, A., Galeati, G., Federici, C., Maranesi, M., Gobetti, A., Zerani, M., & Boiti, C. (2006). Hormonal and metabolic adaptation to fasting: Effects on the hypothalamic–pituitary–ovarian axis and reproductive performance of rabbit does. *Domestic Animal Endocrinology*, 31(2), 105–122. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2005.09.006>
- Brockman, R. P., & Laarveld, B. (1985). Effects of insulin on net hepatic metabolism of acetate and β -hydroxybutyrate in sheep (*Ovis aries*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 81(2), 255–257. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(85\)90131-8](https://doi.org/10.1016/0300-9629(85)90131-8)
- Caldeira, R. M., Belo, A. T., Santos, C. C., Vazques, M. I., & Portugal, A. V. (2007a). The effect of body condition score on blood metabolites and hormonal profiles in ewes. *Small Ruminant Research*, 68(3), 233–241.
- Caldeira, R. M., Belo, A. T., Santos, C. C., Vazques, M. I., & Portugal, A. V. (2007b). The effect of long-term feed restriction and over-nutrition on body condition score, blood metabolites and hormonal profiles in ewes. *Small Ruminant Research*, 68(3), 242–255.

- Capen, C., & Martin, S. (1989). The thyroid gland. *Veterinary Endocrinology and Reproduction*, 58–91.
- Chopra, I. J., Sack, J., & Fisher, D. A. (1975). 3,3',5'-Triiodothyronine (Reverse T₃) and 3,3',5-Triiodothyronine(T³) in Fetal and Adult Sheep: Studies of Metabolic Clearance) Rates, Production Rates, Serum Binding, and Thyroidal Content Relative to Thyroxine. *Endocrinology*, 97(5), 1080–1088. <https://doi.org/10.1210/endo-97-5-1080>
- Dauncey, M. J. (1990). Thyroid hormones and thermogenesis. *Proceedings of the Nutrition Society*, 49(2), 203–215.
- Douglas, G. N., Overton, T. R., Bateman, H. G., Dann, H. M., & Drackley, J. K. (2006). Prepartal Plane of Nutrition, Regardless of Dietary Energy Source, Affects Periparturient Metabolism and Dry Matter Intake in Holstein Cows. *Journal of Dairy Science*, 89(6), 2141–2157. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72285-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72285-8)
- Dunshea, F. R., Bell, A. W., & Trigg, T. E. (1989). Relations between plasma non-esterified fatty acid metabolism and body fat mobilization in primiparous lactating goats. *British Journal of Nutrition*, 62(1), 51–61. <https://doi.org/10.1079/BJN19890007>
- Harmeyer, J., & Schlumbohm, C. (2006). Pregnancy impairs ketone body disposal in late gestating ewes: Implications for onset of pregnancy toxemia. *Research in Veterinary Science*, 81(2), 254–264. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.10.010>
- Heitmann, R. N., Dawes, D. J., & Sensenig, S. C. (1987). Hepatic Ketogenesis and Peripheral Ketone Body Utilization in the Ruminant. *The Journal of Nutrition*, 117(6), 1174–1180. <https://doi.org/10.1093/jn/117.6.1174>
- Hernández, J., Benedito, J. L., & Castillo, C. (2020). Relevance of the study of metabolic profiles in sheep and goat flock. Present and future: A review. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 18(3), e06R01. <https://doi.org/10.5424/sjar/2020183-14627>
- Hu, G., McCutcheon, S. N., Parker, W. J., & Walsh, P. A. (1990). Blood metabolite levels in late pregnant ewes as indicators of their nutritional status. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 33(1), 63–68. <https://doi.org/10.1080/00288233.1990.10430661>
- Kong, W. M., Martin, N. M., Smith, K. L., Gardiner, J. V, Connoley, I. P., Stephens, D. A., Dhillon, W. S., Ghatei, M. A., Small, C. J., & Bloom, S. R. (2004). Triiodothyronine stimulates food intake via the hypothalamic ventromedial nucleus independent of changes in energy expenditure. *Endocrinology*, 145(11), 5252–5258.
- Ladyman, S. R. (2007). Leptin Resistance During Pregnancy in the Rat. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(2), 269–277. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2007.01628.x>
- Lê Cao, K.-A., & Welham, Z. M. (2021). *Multivariate data integration using R: methods and applications with the mixOmics package*. CRC Press.
- McCann, J. P., Bergman, E. N., & Beermann, D. H. (1992). Dynamic and static phases of severe dietary obesity in sheep: food intakes, endocrinology and carcass and organ chemical composition. *The Journal of Nutrition*, 122(3), 496–505.
- Menchetti, L., Brecchia, G., Canali, C., Cardinali, R., Polisca, A., Zerani, M., & Boiti, C. (2015). Food restriction during pregnancy in rabbits: Effects on hormones and metabolites

- involved in energy homeostasis and metabolic programming. *Research in Veterinary Science*, 98, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.11.017>
- Michaux, J. M., Sylvie, F., Romdane, N. M., & Mouthin, G. (1981). Les troubles du metabolisme des corps cetoniques chez les mammifers domestiques. *Rec Med Veterinarie*, 157(6), 471–478.
- Miller, G. A., Auffret, M. D., Roehe, R., Nisbet, H., & Martínez-Álvaro, M. (2023). Different microbial genera drive methane emissions in beef cattle fed with two extreme diets. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1102400>
- Mongini, A., & Van Saun, R. J. (2023). Pregnancy Toxemia in Sheep and Goats. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 39(2), 275–291. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2023.02.010>
- Pesántez-Pacheco, J., Heras-Molina, A., Torres-Rovira, L., Sanz-Fernández, M., García-Contreras, C., Vázquez-Gómez, M., Feyjoo, P., Cáceres, E., Frías-Mateo, M., Hernández, F., Martínez-Ros, P., González-Martin, J., González-Bulnes, A., & Astiz, S. (2019). Influence of Maternal Factors (Weight, Body Condition, Parity, and Pregnancy Rank) on Plasma Metabolites of Dairy Ewes and Their Lambs. *Animals*, 9(4), 122. <https://doi.org/10.3390/ani9040122>
- Pesántez-Pacheco, J. L., Heras-Molina, A., Torres-Rovira, L., Sanz-Fernández, M. V., García-Contreras, C., Vázquez-Gómez, M., Feyjoo, P., Cáceres, E., Frías-Mateo, M., Hernández, F., Martínez-Ros, P., González-Martin, J. V., González-Bulnes, A., & Astiz, S. (2019). Maternal Metabolic Demands Caused by Pregnancy and Lactation: Association with Productivity and Offspring Phenotype in High-Yielding Dairy Ewes. *Animals*, 9(6), 295. <https://doi.org/10.3390/ani9060295>
- Piccione, G., Caola, G., Giannetto, C., Grasso, F., Runzo, S. C., Zumbo, A., & Pennisi, P. (2009). Selected biochemical serum parameters in ewes during pregnancy, post-parturition, lactation and dry period. *Animal Science Papers and Reports*, 27(4), 321–330.
- Ratray, P. V. (1986). Feed requirements for maintenance, gain and production. *Sheep Production*, 2, 75–109.
- Riis, P. M., & Madsen, A. (1985). Thyroxine concentrations and secretion rates in relation to pregnancy, lactation and energy balance in goats. *Journal of Endocrinology*, 107(3), 421–427. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1070421>
- Rook, J. S. (2000). Pregnancy Toxemia of Ewes, Does, and Beef Cows. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 16(2), 293–317. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30107-9](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30107-9)
- Rossi, G., Lapaczewski, P., Diamond, M. P., Jacob, R. J., Shulman, G. I., & Sherwin, R. S. (1993). Inhibitory Effect of Pregnancy on Counterregulatory Hormone Responses to Hypoglycemia in Awake Rat. *Diabetes*, 42(10), 1440–1445. <https://doi.org/10.2337/diab.42.10.1440>
- Rossi, R., Orig, S. D., Del Prete, E., & Scharrer, E. (2000). Suppression of Feed Intake after Parenteral Administration of D-betabeta-Hydroxybutyrate in Pygmy Goats. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 47(1), 9–16. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0442.2000.00255.x>

- RStudio, T. (2020). RStudio: integrated development for R. *Rstudio Team, PBC, Boston, MA* URL [Http://Www. Rstudio. Com](http://www.Rstudio.com).
- Russel, A. (1984). Body condition scoring of sheep. *In Practice*, 6(3), 91–93. <https://doi.org/10.1136/inpract.6.3.91>
- Schlumbohm, C., & Harmeyer, J. (2008). Twin-pregnancy increases susceptibility of ewes to hypoglycaemic stress and pregnancy toxemia. *Research in Veterinary Science*, 84(2), 286–299. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.05.001>
- Silva, J. E. (2005). Thyroid Hormone and the Energetic Cost of Keeping Body Temperature. *Bioscience Reports*, 25(3–4), 129–148. <https://doi.org/10.1007/s10540-005-2882-9>
- Sivan, E., Homko, C. J., Chen, X., Reece, E. A., & Boden, G. (1999). Effect of insulin on fat metabolism during and after normal pregnancy. *Diabetes*, 48(4), 834–838. <https://doi.org/10.2337/diabetes.48.4.834>
- Swali, A., & Wathes, D. C. (2007). Influence of primiparity on size at birth, growth, the somatotrophic axis and fertility in dairy heifers. *Animal Reproduction Science*, 102(1–2), 122–136. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.10.012>
- Todini, L. (2007). Thyroid hormones in small ruminants: effects of endogenous, environmental and nutritional factors. *Animal*, 1(7), 997–1008. <https://doi.org/10.1017/S1751731107000262>
- Todini, L., Malfatti, A., Valbonesi, A., Trabalza-Marinucci, M., & Debenedetti, A. (2007). Plasma total T3 and T4 concentrations in goats at different physiological stages, as affected by the energy intake. *Small Ruminant Research*, 68(3), 285–290. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.11.018>
- Utiger, R. D. (2001). The thyroid: physiology, thyrotoxicosis, hypothyroidism, and the painful thyroid. *Endocrinology & Metabolism*, 261–348.
- van der Drift, S. G. A., Jorritsma, R., Schonewille, J. T., Knijn, H. M., & Stegeman, J. A. (2012). Routine detection of hyperketonemia in dairy cows using Fourier transform infrared spectroscopy analysis of β -hydroxybutyrate and acetone in milk in combination with test-day information. *Journal of Dairy Science*, 95(9), 4886–4898. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4417>
- Yildiz, A., Balikci, E., & Gurdogan, F. (2005). Changes in some serum hormonal profiles during pregnancy in single-and twin foetus-bearing Akkaraman sheep. *Medycyna Weterynaryjna*, 61(10).
- Yıldırım, M., Çakır, D. Ü., & Yurtman, İ. Y. (2022). Effects of restricted nutrition and flushing on reproductive performance and metabolic profiles in sheep. *Livestock Science*, 258, 104870. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2022.104870>
- Zhang, S., Blache, D., Blackberry, M. A., & Martin, G. B. (2005). Dynamics of the responses in secretion of luteinising hormone, leptin and insulin following an acute increase in nutrition in mature male sheep. *Reproduction, Fertility and Development*, 16(8), 823–829.