



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE
LA SALUD ANIMAL**

NUTRICIÓN ANIMAL

**IDENTIFICACIÓN DE UN CUADRO DE ESTRÉS OXIDATIVO EN VACAS
LECHERAS EN ESTABULACIÓN DURANTE SU CICLO PRODUCTIVO**

T E S I S

PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS

**P R E S E N T A:
SUSANA ZÁRATE EPSTEIN**

TUTOR PRINCIPAL

Dr. ANTONIO DÍAZ CRUZ

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN ANIMAL Y BIOQUÍMICA, FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

PhD. MA. ESTHER ORTEGA CERRILLA

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

Dr. LUIS CORONA GOCHI

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN ANIMAL Y BIOQUÍMICA, FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA, UNAM

MÉXICO, D.F. ABRIL 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

IDENTIFICACIÓN DE UN CUADRO DE ESTRÉS OXIDATIVO EN VACAS LECHERAS EN ESTABULACIÓN DURANTE SU CICLO PRODUCTIVO

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Antonio Díaz Cruz, en el Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Antonio Díaz Cruz	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.
PhD. Ma. Esther Ortega Cerrilla	Colegio de Postgraduados. Texcoco, México.
Dr. Luis Corona Gochi	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

Se reconoce la asesoría técnica al M.C. MVZ. Carlos Acosta Trujillo en la realización del diseño estadístico de este proyecto de investigación

Se reconoce la asesoría técnica al M.C. MVZ. Juan José Flores Malpica en la realización de las técnicas aplicadas de laboratorio en este proyecto.

Se reconoce la asesoría al M.C. MVZ. Cuauhtémoc Nava Cuéllar en el apoyo brindado en el laboratorio de Bioquímica, FMVZ durante este proyecto.

Se reconoce el apoyo en la realización de este proyecto de investigación al M.C. MVZ. José Guadalupe Cruz Pérez.

El proyecto fue apoyado parcialmente por DGAPA IT222611-3. Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el mes de abril del año 2014.

El Jurado de Examen de maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Joel Hernández Cerón	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.
Secretario	Dr. Antonio Díaz Cruz	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.
Vocal	Dr. Ángel Pulido Albores	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.
Suplente	Dr. Luis Arturo García Hernández	División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM.
Suplente	Dr. Rene Carlos Calderón Robles	Coordinación y vinculación del estado de Puebla, INIFAP, Puebla.

RESUMEN

La producción mundial de leche ha crecido en las últimas décadas, el 50% de la producción se concentra en 8 países. En el 2011, nuestro país ocupó el decimosexto lugar. México necesita acrecentar la producción láctea debido al aumento en la densidad poblacional. Un incremento en las exigencias productivas y metabólicas de la vaca lechera, se ve reflejado en un mayor consumo de oxígeno y por consiguiente, un riesgo elevado para el desarrollo de un cuadro de estrés oxidativo, alteración metabólica relacionada con problemas de mastitis, infertilidad o hipocalcemia, entre otras. El objetivo de esta investigación fue identificar la presencia de un posible cuadro de estrés oxidativo en vacas lecheras Holstein en estabulación durante su ciclo productivo a través de algunos indicadores metabólicos como son: FRAP (capacidad antioxidante), TBARS (peroxidación lipídica), determinación de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa y cuantificación de los niveles plasmáticos de ácido ascórbico (vitamina C), con la finalidad de señalar un uso factible de antioxidantes y sus beneficios a los índices productivos. Se trabajó con plasma proveniente de 80 vacas de 1 a 9 meses de gestación y diez días después de parir; estas vacas fueron divididas en 10 grupos de 8 vacas cada uno, acorde al tiempo de gestación (Grupo 1 al 9), y 10 días después de parir (Grupo 10). Se utilizó un diseño aleatorizado. Los datos obtenidos se analizaron por medio de análisis de varianza y las medias por la prueba de Tukey. Los resultados indican que la capacidad antioxidante (FRAP), se encuentra elevada solo en los grupos 2 y 4 (1.747 y 1.754 nmol Fe [II] /mL de plasma respectivamente); mientras que en los demás grupos, se observó una disminución gradual, aunque sin diferencias estadísticas, sin embargo, en el grupo 10 se presentaron los valores más bajos $P < 0.05$ (1.0876 nmol Fe [II]/mL). En peroxidación lipídica (TBARS) se registró un aumento progresivo a partir del quinto mes de gestación (grupo 5) y se continuó hasta 10 días después de parir (grupo 10), con una concentración 111.62 nmol de MDA/mL. Para la actividad de la enzima glutatión peroxidasa; se encontró un comportamiento igual al de peroxidación lipídica, aumentando a partir del quinto mes de gestación (grupo 5) con un valor de 42.10 $\mu\text{mol NADPH}/\text{min}$, y se mantuvo hasta 10 días después de parir (grupo 10). En cuanto al ácido ascórbico se refiere, el nivel más bajo (29.07 nmol/mL), se registró en el octavo mes de gestación (grupo 8). Con base en los resultados obtenidos en este trabajo se sugiere la inclusión de antioxidantes en la dieta de la vaca lechera a partir del segundo tercio de gestación y hasta el final del periodo de transición, con el propósito de controlar la producción basal de especies reactivas del oxígeno durante este periodo y evitar así, el desarrollo de un cuadro de estrés oxidativo que pudiera ser el responsable de algunas alteraciones metabólicas presentes en el periparto.

Apoiado parcialmente por DGAPA IT222611-3.

Palabras clave: Estrés oxidativo, vacas lecheras, FRAP, TBARS, actividad de la glutatión peroxidasa, ácido ascórbico.

ABSTRACT

Global milk production has grown exponentially in recent decades, 50% of the production is concentrated in eight countries. In 2011, our country was ranked in the 16th place. Mexico needs to improve milk production due to increased population density. In dairy cow higher production and metabolic requirements, is reflected by increased oxygen consumption and therefore a high risk for the development oxidative stress, metabolic disorder related diseases such as mastitis, infertility or hypocalcemia, among others.

The aim of this study was to identify the possible presence of oxidative stress in Holstein dairy cows in confinement during its production cycle through some metabolic indicators such as: FRAP (antioxidant capacity), TBARS (lipid peroxidation), activity of the enzyme glutathione peroxidase and quantifying levels of ascorbic acid (vitamin C), in order to indicate the possible use of antioxidants and benefiting their productive parameters. We worked with plasmas of 80 cows divided into 10 groups of 8 cows each group, from 1 to 9 months of pregnancy (group 1 to 9) and 10 days after calving (group 10). We conducted a randomized design, analysis of variance ($P < 0.05$) and Tukey's multiple comparison test. The results indicate that the antioxidant capacity (FRAP) is elevated only in groups 2 and 4 (1747 and 1754 nmol Fe [II] / mL respectively), whereas in the other groups, were declining gradually, but without statistical differences, however, statistical differences were shown in group 10 presenting the lower values (1.0876 nmol Fe [II] / mL). A progressive increase in lipid peroxidation (TBARS) was observed from the fifth month of pregnancy (group 5) and continued until 10 days after birth (group 10), with a concentration of 111.62 mmol MDA / mL. The glutathione peroxidase enzyme activity showed the same tendency of lipid peroxidation, starting with a value of 42.10 $\mu\text{mol NADPH} / \text{min}$, at the fifth month of pregnancy (group 5) and continued until 10 days after birth (group 10). The lowest levels of ascorbic acid were recorded in the eighth month of pregnancy (7.29 nmol / mL). With the data obtained in this work is concluded that dairy cows presents oxidative stress during the second trimester of pregnancy until the transition period; we suggests the addition of antioxidants in the diet starting in the second trimester of pregnancy, in order to avoid the presence of oxidative stress during this period, responsible of metabolic diseases in peripartum.

Partially supported by DGAPA IT222611-3.

Keywords: Oxidative stress, dairy cows, FRAP, TBARS, glutathione peroxidase activity, ascorbic acid.

CONTENIDO

	Páginas
RECONOCIMIENTOS.....	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN.....	5
JUSTIFICACIÓN	15
HIPÓTESIS.....	15
OBJETIVOS.....	15
MATERIAL Y MÉTODOS	16
RESULTADOS	20
DISCUSIÓN	24
CONCLUSIÓN.....	26
REFERENCIAS.....	27
ANEXOS	32

1. INTRODUCCIÓN

La producción mundial de leche ha crecido en forma exponencial en las últimas décadas, el 50% de la producción se concentra en 8 países, México ocupó en el 2011 el decimosexto lugar, con una participación de 10,724,288 de toneladas de leche. Recientemente la producción de leche en polvo ha disminuido y los precios se han incrementado en forma acelerada. La producción mundial de leche fresca de bovino ha crecido y solo en unos cuantos países se concentra más de la mitad de la producción. Siendo el país con mayor participación Estados Unidos de América, con una producción de 89,015,235 de toneladas de leche (FAOSTAT, 2011). Son pocas las empresas que controlan este producto y que se ven favorecidas, ya que los países desarrollados consideran a la leche como un alimento de primera necesidad. Sin embargo, a partir del 2006, el precio de la leche aumentó; en algunos países se ha retirado el subsidio a la exportación, lo que puede generar oportunidades para México (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación 2007-2012).

Con la finalidad de incrementar los parámetros productivos y reproductivos en la vaca lechera, las prácticas de manejo se intensifican y el riesgo a sufrir enfermedades también aumenta (Goff *et al.*, 1997; Bell *et al.*, 1997; Persson Waller, 2000), por ejemplo, hígado graso y cetosis, al igual que algunos problemas reproductivos (Goff *et al.*, 1997; Rukkwamsuk *et al.*, 1999). Por otro lado, en el periodo de transición, el cual comprende las cuatro semanas previas al parto y cuatro semanas posteriores a este, la incidencia de mastitis aumenta (Seegers *et al.*, 2003), así como las enfermedades subclínicas se tornan clínicas (Kimura *et al.*, 1999), debido a un estado de supresión inmunológica (Saad *et al.*, 1989; Kehrl *et al.*, 1989; Mallard *et al.*, 1998). Durante el desarrollo de alteraciones metabólicas y enfermedades infecciosas, se ha demostrado la presencia de un cuadro de estrés oxidativo, lo que no está claro, es si este desequilibrio oxidante, es causa o efecto de dichas patologías. Explorar la posible presencia de un cuadro de estrés oxidativo, durante el ciclo productivo de la vaca lechera, fue el objetivo de este trabajo.

1.1 Generalidades

Los organismos aeróbicos utilizan el oxígeno como un aceptor de electrones, los cuales han sido extraídos de una variedad de sustratos orgánicos (glucosa, cetoácidos, ácidos grasos y aminoácidos) con la finalidad de producir adenosin trifosfato (ATP), vía la fosforilación oxidativa.

A nivel mitocondrial, la transferencia de dos electrones al oxígeno produce como producto final el agua, a través de la cadena respiratoria. Este proceso enzimático no es del todo eficiente, ya que algunos de sus intermediarios, facilitan la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), entre ellas los radicales libres (RL) los cuales son tóxicos para la célula. Fuera de la mitocondria, el metabolismo celular produce de modo constante ROS, debido al potencial daño que estos oxidantes pueden causar a la célula, esta tuvo que desarrollar un mecanismo de

defensa, llamado sistema antioxidante. Tanto los oxidantes como los antioxidantes, forman parte del sistema salud- enfermedad, importante para los seres vivos (Castrejón, 2009).

Un RL se define como cualquier átomo o entidad molecular que cuenta con uno o más electrones desapareados, lo que incrementa su reactividad química, ya que requiere completar su par electrónico para alcanzar su estabilidad. El radical puede ceder su electrón desapareado (radical reductor), o puede abstraer un electrón (radical oxidante) de una molécula estable (Castillo *et al*, 2000).

Clasificación

Los RL se clasifican de acuerdo con el átomo que posee el electrón desapareado. Por lo que hay radicales centrados en oxígeno, centrados en nitrógeno, centrados en el carbono, etc. En los sistemas biológicos los más comunes son los centrados en el oxígeno y los centrados en el nitrógeno. Los radicales centrados en el carbono resultan de las reacciones de los primeros sobre diversas biomoléculas no radicales (Castrejón, 2009; Castillo *et al*, 2000).

Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

ROS	Particularidades
Anión superóxido ($\cdot\text{O}^{\cdot-}_2$)	Formado en reacciones de autooxidación (flavoproteínas, ciclo redox).
Radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$)	Formado en las reacciones de Fenton o en la de Haber-Weiss catalizada por metales (hierro). Es la especie de vida media más corta y el más reactivo de todos. Puede captar los electrones de tioles, interactúa con las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos, alterando la información genética de las células. También estimula la peroxidación lipídica, afectando a los fosfolípidos de las membranas celulares.
Radical peroxilo ($\text{ROO}\bullet$)	Formado a partir de hidroperóxidos orgánicos o del ROOH por pérdida de H^+ .
Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	Formado a partir de la dismutación del $\cdot\text{O}^{\cdot-}_2$. Al no contener electrones desapareados no es considerado como radical libre. Es generador de OH^{\cdot} .
Ácido hipocloroso (HOCl)	Producido durante el estallido respiratorio en los linfocitos. Se origina a partir del H_2O_2 por acción de la mieloperoxidasa. No es un radical libre.
Óxido nítrico (NO)	Producido por la unión del oxígeno con el nitrógeno. (Rajaraman <i>et al.</i> , 1998).
Ozono (O_3)	Especie molecular formada por 3 átomos de oxígeno. Tampoco es considerado como un radical libre.
Oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$)	Es el oxígeno molecular simple, el primer estado excitado. Se forma por la activación del O_2 (luz solar, radiaciones).

El modo de actuar de los RL se divide en tres pasos: Reacción de iniciación, de propagación y terminación.

Reacción de iniciación

En estas reacciones se convierte una molécula no radical a un RL, requiere de un catalizador físico como luz ultravioleta o químico como enzimas, agentes reductores o metales. Los mecanismos productores de radicales son: a) Pérdida de un solo electrón de una molécula no radical para formar un radical; b) Adición de un electrón a una molécula no radical; c) Ruptura homolítica del enlace covalente de una molécula no radical, en la que cada molécula retiene uno de los electrones de un par compartido (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Reacción de autopropagación

En esta reacción un RL formado como resultado del proceso de iniciación se une a un no radical, lo cual origina una segunda especie de radical. Las nuevas especies de radicales libres formados como efecto de esta reacción pueden actuar a su vez con otras moléculas no radicales, lo cual inicia una reacción en cadena (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Reacción de terminación

Dos radicales libres reaccionan entre sí, pueden unir sus electrones que están desapareados y establecer un enlace covalente, dejando de ser un radical. Otro mecanismo de terminación es cuando un radical es reducido por un agente donador de electrones libres, por ejemplo los antioxidantes (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Un modelo experimental para esquematizar las diferentes reacciones en las que interviene los RL, es la reacción de Fenton; en ella el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) un no radical, es escindido homolíticamente a un anión hidroxilo OH^- y un radical hidroxilo OH^\bullet por medio de un metal de transición, como el hierro (Campbell y Miller, 1998). Esto es, del estado reducido (ferrosos, Fe [II]) al oxidado (férrico, Fe [III]) al perder un electrón utilizado para romper el enlace covalente entre los dos átomos de oxígeno en el H_2O_2 . Se pueden utilizar otros metales de transición, como es el cobre; la luz ultravioleta también se comporta como catalizador físico (Leung, 1998; Inanami *et al.*, 1999).

Los animales producen de una manera constante ROS como resultado del metabolismo de diversas sustancias, así mismo el medio circundante proporciona condiciones que favorecen su síntesis, como son agentes químicos (humo, plaguicidas, conservadores, colorantes, etc.), así como la luz ultravioleta.

Fuentes endógenas de radicales libres

Dentro de las fuentes internas en la generación de los RL están: 1) Metabolismo intermediario, 2) Fagocitosis, 3) Metabolismo de xenobióticos.

1.2 SISTEMA DE ANTIOXIDANTES

Un antioxidante es una sustancia que se encuentra en bajas concentraciones con respecto a un sustrato oxidable, retrasando o inhibiendo la oxidación de este sustrato. Los antioxidantes previenen el daño que pueden causar los RL a las biomoléculas y estructuras submoleculares.

Los sistemas antioxidantes se clasifican en endógenos y exógenos según su origen. Los endógenos son los que se sintetizan en el organismo y se dividen en enzimáticos como dismutasa de superóxido (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GSH-Px), tiorredoxinas, entre otras; y los no enzimáticos como glutatión (GSH/GSSG), lactoferrina y ferritina, transferrina, ceruloplasmina, albumina, hemopexina y hepatoglobina.

Antioxidantes endógenos enzimáticos

Dismutasa de superóxido (SOD)

Son una familia de isoenzimas, que catalizan la dismutación del $O^{\bullet-}_2$ para obtener O_2 y H_2O_2 . En humanos se conocen tres isoformas SOD-Zn²⁺/Cu, se localiza en citoplasma, SOD-Mn³⁺, ubicada en la matriz mitocondrial y una SOD-extracelular, secretada hacia el líquido extracelular y plasma sanguíneo. A nivel mitocondrial, donde se produce una gran cantidad de energía, la SOD requiere de manganeso como cofactor.

Catalasa (CAT)

Se encuentra en los peroxisomas de la mayoría de las células. Cataliza la conversión de moléculas de H_2O_2 en dos moléculas de agua y una de O^{2*} previniendo la formación de radicales hidroxilo a través del mecanismo de Fenton. Trabaja sucesivamente después de SOD ya que el producto de este, es el sustrato de la catalasa (Halliwell B, Gtteridge JM, 1999).

Glutación peroxidasa (GSH-Px)

Es una selenoproteína citosólica que cataliza la reducción de H_2O_2 en dos moléculas de agua, utilizando los electrones de hidrógeno que dona el tripéptido glutatión. El selenio se requiere para la actividad de la glutatión peroxidasa (GSH-Px).

La SOD atrapa a los radicales libres del citoplasma y los convierte en peróxido de hidrógeno, que posteriormente es procesado por la GSH-Px. Enzimas como tioredoxina reductasa (TrxR) se ha demostrado que inactivan al peróxido de hidrógeno y a los peróxidos de los ácidos grasos produciendo agua y alcohol respectivamente. Su actividad complementa a la glutatión peroxidasa. (Sordillo *et al*, 2007).

Antioxidantes exógenos

Son compuestos de bajo peso molecular, que provienen de la dieta como: la vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (alfa tocoferol), beta carotenos (provitamina A), elementos traza (selenio, cobre, zinc y manganeso), ácido lipóico y otros antioxidantes como los compuestos fenólicos. Estos antioxidantes funcionan como atrapadores de RL por lo tanto es importante entender que los antioxidantes exógenos son nutrientes que ayudan a la eliminación de los ROS (Halliwell y Gutteridge, 1999).

1.3 ESTRÉS OXIDATIVO

Cuando la producción de RL rebasa la capacidad antioxidante de la célula, estos afectan estructuralmente moléculas como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos entre otras, causando modificaciones en su función biológica, esta condición se traduce en una alteración metabólica de la célula, situación que se identifica como estrés oxidativo. El estrés oxidativo ocurre en un daño por trauma, infección, estrés calórico, radiación, hipoxia, inflamación, presencia de toxinas y ejercicio excesivo.

1.4 DAÑO OXIDATIVO A BIOMOLÉCULAS

Daño oxidativo a los lípidos

Los ácidos grasos poliinsaturados son oxidados por los ROS en un proceso conocido como lipoperoxidación. Las membranas celulares están constituidas por fosfolípidos, los cuales contienen ácidos grasos poliinsaturados susceptibles a un deterioro oxidativo, causando alteraciones funcionales de la membrana y por lo tanto una posible disfunción de la célula. Los ácidos grasos

poliinsaturados (AGP) como el ácido araquidónico son fácilmente atacados por los radicales libres convirtiéndose en lípidos peroxidados. En contraste los ácidos grasos monoinsaturados y los saturados (AGS) son más resistentes al ataque de los radicales libres. Los lípidos peroxidados son tóxicos y causan daño a las células.

La lipoperoxidación se inicia cuando un radical libre extrae un átomo de hidrógeno de un grupo metilo. Este proceso se impulsa cuando existen enlaces carbono-hidrógeno adyacentes a dobles ligaduras, ocasionando la formación de radicales lipoperoxilos, los cuales tienden a abstraer otro átomo de hidrógeno de su lípido vecino por lo que se desarrolla una reacción en cadena que desestabiliza la membrana plasmática. El aumento en la concentración de los productos finales de la lipoperoxidación como el MDA (malondialdehído) o bien la identificación de dienos conjugados, son una evidencia de la presencia de radicales libres (Halliwell, 1999; Castillo *et al.*, 2000; Castrejón, 2009; Frankel, 1991).

La reacción antioxidante más importante, pero no la única en la ruptura de cadenas de lípidos, es la de α -tocoferol a tocoferol, reduciendo el ácido ascórbico que se encuentra en la superficie de las membranas (Esterbauer *et al.*, 1989; Tappel 1968). El glutatión reducido (GSH) también contribuye al reciclaje del α -tocoferol.

Daño oxidativo a las proteínas

El deterioro funcional de las proteínas ocasionado por los ROS conlleva a una alteración metabólica celular, que conduce a un estado apoptótico de la célula ya que se llega a afectar la función de enzimas, transportadores, receptores, etc. El principal daño protéico es la modificación a los grupos radicales de los residuos de aminoácidos de las proteínas; los más susceptibles son: cisteína, lisina, arginina y prolina modificando la vida media y función de la proteína (Halliwell *et al.*, 1989).

Daño Oxidativo al DNA

Los ROS atacan al esqueleto de desoxirribosa del DNA o a cualquiera de sus bases nitrogenadas, provocando que se altere la conformación de la doble hélice y por lo tanto, la información genética. El DNA tiene grupos reactivos en sus bases nitrogenadas que son muy susceptibles al ataque de los radicales libres, el daño oxidativo del DNA ocasiona mutaciones. Las glucosilasas específicas del DNA reparan de manera eficaz la mayor parte de las lesiones oxidativas, pero la reparación no es del todo eficiente y se acumula con la edad, en la división celular las lesiones se vuelven estables y dan como resultado transformaciones que pueden llegar a evolucionar a cáncer.

Daño Oxidativos a los carbohidratos

Los carbohidratos están sujetos al ataque de los radicales libres en menor proporción que otras moléculas. La glucosa, el manitol o ciertas desoxirribosas pueden reaccionar con radicales OH^{\cdot} para producir sustancias reactivas. Los polisacáridos pueden sufrir ataque por parte de los radicales libres causando su fragmentación, estos monosacáridos una vez oxidados forman moléculas capaces de reaccionar con el radical amino de las proteínas vía su grupo carbonilo, lo que origina la acumulación de productos finales de glucosilación avanzada.

1.5 Estrés oxidativo en vacas lecheras

En la mastitis, los fagocitos migran al sistema de ductos de la glándula mamaria en respuesta al estímulo bacteriano, lo que causa una excesiva producción de ROS en el tejido y un posible cuadro de estrés oxidativo, esto depende de la protección antioxidante con que cuente el animal. Los antioxidantes pueden optimizar la salud en animales que experimentan un mayor riesgo de estrés oxidativo, debido a sus elevadas exigencias productivas.

Una de las mayores fuentes de antioxidantes son los forrajes, sin embargo hay varios factores que pueden hacer cambiar este aporte; como el tipo de suelo, estado de madurez de la planta y el almacenamiento del forraje; disminuyendo así la concentración de vitaminas. El confinamiento y el estrés calórico también contribuyen a aumentar los requerimientos de antioxidantes en los animales. La suplementación de antioxidantes mejora la respuesta inmune y disminuye el estrés oxidativo generando una mayor resistencia a enfermedades infecciosas y degenerativas (Chew PB, 1993).

La prevalencia y gravedad de ciertas patologías de las vacas lecheras, en particular la mastitis, parecen estar relacionadas con el estrés oxidativo, afectándose la calidad de la leche, el número de células somáticas y la cantidad de nutrientes antioxidantes de la leche.

En un estudio, 66 vacas fueron alimentadas con forraje fresco, ensilado, maíz y soya; durante el periodo seco con tres diferentes tratamientos: 1) 100 UI de vitamina E por día, durante el periodo seco y los primeros 30 días de lactación; 2) 1000 UI de vitamina E durante el periodo seco y 500 UI de vitamina E durante la lactación; 3) 1000 UI de vitamina E los primeros 46 días del periodo seco, 4000 UI de vitamina E los últimos 14 días del periodo seco y 2000 UI de vitamina E durante la lactación. El selenio fue suplementado a una ración 0.1 ppm en los tres grupos de estudio. Durante los primeros 7 días de lactación se observó que la mastitis clínica afectó al 25%, 16.7%, 2.6% de las vacas que recibieron las dietas con concentraciones baja, media y alta de vitamina E respectivamente. El porcentaje de infecciones intramamarias en la lactación no fue diferente en vacas alimentadas con concentraciones de vitamina E, media y baja (32%), pero en las dietas que tenían concentraciones altas de vitamina E se redujo los casos de mastitis post-lactación en un 67% (Weiss et al, 1997)

En trabajos realizados por Miller y Brzezinska-Slebozinska (1993) en rumiantes empleando diferentes dosis de vitamina E en la dieta, se demostró una disminución en la incidencia de enfermedades, mejorando la respuesta inmune y la productividad. Estos autores estudiaron el

balance de antioxidantes y estrés oxidativo en 64 vacas gestantes, divididas en dos grupos, el primer grupo recibió una dieta suplementada con 160 UI vitamina E al día y el segundo grupo de vacas recibieron una dieta suplementada con 1000 UI vitamina E al día. Se observó que los niveles de α -tocoferol en suero disminuyeron durante las últimas seis semanas de gestación en las vacas que recibieron una suplementación de 160 UI vitamina E, a diferencia de las que recibieron una suplementación con 1000 UI de vitamina E, aumentando los niveles de α -tocoferol. Además se observó una disminución de TBARS como indicador de la lipoperoxidación. La cual tuvo una correlación negativa con el total de antioxidante en suero (α -tocoferol) y TBARS; ya que al incrementar la lipoperoxidación el nivel de antioxidantes total disminuye (Miller, Brezezinska-Slebodzinska, 1993). Los trabajos anteriores concuerdan con los resultados reportados por Smith donde se administró en vacas antes del parto, acetato alfa-tocoferilo (grupo 1) y selenio (grupo 2) y se observó que los antioxidantes disminuyeron la incidencia de mastitis clínica en un 37% con alfa-tocoferilo y un 12% con selenio (Smith *et al*, 1984).

Harrison realizó un experimento en vacas, evaluando la presentación de enfermedades reproductivas; donde se les administró vitamina E y selenio; la incidencia en retención placentaria se redujo en su totalidad, cuando se suplementó con vitamina E y Se, en comparación con el grupo control (retención placentaria 17.5%). El selenio, fue efectivo para disminuir la incidencia de quistes ováricos y metritis, reduciendo de un 47% a 19% y de 83% a 65% respectivamente (Harrison *et al*, 1984). Además en las vacas lecheras, al ser suplementadas con 1000 UI de vitamina E durante el periodo seco y al principio de la lactación, se reportó una mejoría en la incidencia de mastitis, retención placentaria, quistes ováricos, metritis, así como la tasa de gestación al primer servicio, servicio por concepción e intervalo de lactancia-concepción (Allison y Laven, 2000). En otros estudios, Campbell evaluó la eficiencia reproductiva en vacas y novillas donde observó que la suplementación con alfa-tocoferilo y zinc disminuyó en 19 días al primer estro ($P < 0.003$). La vitamina E redujo en nueve días al primer servicio (inseminación artificial), extendiéndose el efecto antioxidante durante la lactación. El tratamiento no tuvo impacto en la incidencia de retención placentaria y la producción láctea (Campbell *et al*, 1998). Estos resultados no concuerdan con los estudios realizados por Harrison (1984), en donde se observó una disminución en la incidencia de la presentación de retención placentaria.

Sesenta y cuatro vacas fueron alimentadas seis semanas antes del parto con forraje fresco, concentrado, acetato alfa-tocoferilo y selenio, un grupo de estos animales no se suplementó con ningún antioxidante. Las vacas que tuvieron retención placentaria presentaron un estado antioxidante menor a diferencia de las vacas suplementadas con vitamina E que tuvieron entre 27% y 28% menos lipoperoxidación (TBARS), demostrando la capacidad antioxidante de la vitamina E. La vitamina E redujo la retención placentaria en un 33%, el selenio en un 47% y en conjunto la vitamina E y Se, redujeron la retención placentaria en un 50%, en comparación con los controles negativos (Brzezinska-Slebodzinska *et al*, 1994).

Arechiga *et al*. (1994) realizaron un estudio en donde se administró antioxidantes (vitamina E y Se) a 198 vacas, tres semanas antes de la lactación. Se observó una disminución en la retención placentaria del 70% en comparación con el grupo control; una mejoría en los parámetros reproductivos, incluyendo un aumento en la tasa de gestación del 25.3% (grupo control) al 41.2% (con antioxidantes); servicio por concepción de 2.8 servicios (grupo control) a 2.3 servicios (con antioxidantes); también se redujo el intervalo de lactación-concepción de 141 días (control) a 121 días (con antioxidantes) (Arechiga *et al*, 1994).

Por su parte, Weiss *et al.* (2004), en un estudio con veintiún vacas, las que fueron sometidas a una infusión intramamaria de *E.coli* y en donde se determinaron las concentraciones de vitamina C en plasma y en leche, se observó que en los animales sometidos a la infusión de *E.coli* la concentración de vitamina C en plasma disminuyó 39% y en la leche 52% en comparación al grupo control.

Un aumento en las concentraciones plasmáticas de malondialdehído (MDA), como indicativo de lipoperoxidación y una disminución del estado antioxidante total (TAS) ocurre alrededor del parto. Castillo *et al.* (2005) demostraron que al administrar antioxidantes en el periodo seco y al principio de la lactación, ayuda a reducir la lipoperoxidación y aumenta el estado antioxidante total durante el periodo de periparto.

Por otro lado Lauzon *et al.* (2005) trabajaron con cultivo celular de epitelio mamario bovino en presencia de neutrófilos, donde observaron que el daño causado por estos disminuye al administrar antioxidantes. Esto demuestra que los antioxidantes son una herramienta para proteger efectivamente el tejido mamario contra el estrés oxidativo inducido por los neutrófilos durante la mastitis.

El incremento de TBARS antes y después del parto confirma que en el periodo de transición las vacas se encuentran en estrés oxidativo. Las vacas durante el periodo de periparto que tiene una condición corporal alta, presentan una elevada movilización de los lípidos, siendo susceptibles a una lipoperoxidación (Bernabucci *et al.*, 2005).

En un estudio observacional realizado por Sordillo *et al.* (2007) en vacas, se evaluaron muestras de sangre a los 21 días antes del parto, durante el parto y a los 21 días después del parto. Se extrajeron células mononucleares y se midió la actividad de la glutatión peroxidasa. Se encontró que en vacas en etapa de transición, la actividad de esta enzima es mayor, lo que puede ser indicador de estrés oxidativo. También se demostró que la actividad de la tioredoxin reductasa, que es un mecanismo antioxidante se encuentra comprometida durante el periodo de periparto.

El grupo de estudio de Bouwstra *et al.* (2005), trabajó con vacas primerizas, tomó un grupo control sin suplementación y el otro grupo se suplementó con 3000 UI de vitamina E durante 60 días antes del parto. Se tomaron muestras de sangre antes del parto, el día del parto y después del parto. Las concentraciones de MDA (lipoperoxidación) aumentaron en el parto, indicando que las vacas experimentaron estrés oxidativo en el periodo de periparto. La vitamina E disminuye significativamente las concentraciones de MDA en las vacas primerizas suplementadas aun después de dos semanas después del parto, indicando que la vitamina E juega un papel importante en la recuperación de estrés oxidativo relacionado con el parto.

La glutatión peroxidasa se encuentra disminuida durante el periodo seco y se encuentra elevada durante el inicio de la lactación, indicando que el estrés oxidativo activa a esta enzima durante y después del parto. La habilidad para controlar el estrés oxidativo modifica el estado

proinflamatorio en las vacas cercanas al parto y reduce la incidencia y severidad de la mastitis y otras enfermedades (Aitken *et al.*, 2009).

El desbalance que causan las especies reactivas del oxígeno tiene un efecto negativo en el desempeño de las vacas lecheras. La SOD, GSH-Px y catalasa son enzimas del sistema antioxidante que controlan a los radicales libres dentro de la célula. Los antioxidantes como la vitamina C, glutatión, vitamina E y β -carotenos pueden detener la reacción en cadena de oxidación. Para optimizar el desempeño de las vacas, el estrés oxidativo debe ser controlado por medio de la suplementación con antioxidantes (Miller *et al.*, 1993). Estudios como el de Sordillo *et al.* (2009) indican que el estrés oxidativo puede llevarnos a signos clínicos en vacas lecheras, que pueden incluir enfermedades como la mastitis, retención placentaria y quistes ováricos. La inflamación no controlada es un factor determinante para el desarrollo de dichas enfermedades. El estrés oxidativo es un factor que afecta la respuesta inmune e inflamatoria durante el estrés metabólico. La suplementación de vitamina A, E, C y el selenio ayudan a disminuir la inflamación (Sordillo *et al.*, 2009).

1.9 Justificación

Con base en lo anterior hay evidencia, que sugiere que las vacas productoras de leche en estabulación desarrollan cuadros de estrés oxidativo durante su ciclo productivo.

El presente estudio pretende analizar la presencia de cuadros de estrés oxidativo durante la etapa productiva de estos animales y si ese es el caso sugerir el uso de antioxidantes y así evitar las posibles patologías relacionadas con esta alteración metabólica.

1.10 Hipótesis

Existe una relación directa entre el estado fisiológico de vacas lecheras Holstein en estabulación en las diferentes etapas del ciclo productivo y la presencia de cuadros de estrés oxidativo.

1.11 Objetivo General

Identificar la presencia de un posible cuadro de estrés oxidativo en vacas lecheras Holstein en estabulación durante su ciclo productivo a través de algunos indicadores metabólicos oxidativos, con la finalidad de definir el posible uso de antioxidantes.

1.12 Objetivos Específicos

Estimar en plasma el estado oxidativo de las vacas lecheras Holstein en estabulación en las diferentes etapas de su ciclo productivo a través de la determinación de FRAP (Poder antioxidante/reducción férrica), determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), actividad de la glutatión peróxidasa y de vitamina C (ácido ascórbico).

Identificar si existe un cuadro de estrés oxidativo en vacas lecheras Holstein en estabulación en los diferentes estados fisiológicos dentro de su ciclo de producción de 1 a 9 meses de gestación, y a los 10 días después del parto.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Localización

El Municipio de Tizayuca se encuentra a 52 kilómetros de la Ciudad de México, por la carretera México-Laredo. Está situado a los 19° 50', de latitud Norte y 98° 59', de longitud Oeste del Meridiano de Greenwich, a una altura de 2,260 metros sobre el nivel del mar. La temperatura promedio anual es de 14.7°C, siendo en el mes de mayo la máxima con 17.3°C, y en diciembre la mínima con 11.7°C. La precipitación pluvial es de 368.3 mm³ anuales. El periodo lluvioso comprende los meses de mayo a octubre, el tiempo seco comprende los meses de noviembre a abril (www.tizayuca.gob.mx).

Este estudio se llevó a cabo en la cuenca lechera de Tizayuca. Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca S.A. (CAITSA), Parque industrial Tizayuca Hidalgo, establo 182 calle Sur 3 C.P. 43800.

2.2 Animales, manejo y diseño

Animales: Bovinos, hembras raza Holstein con pesos entre 450 y 650 kg. Edades: de 36 a 84 meses. Se utilizaron 80 vacas Holstein, en diferentes estados productivos (gestación, lactación y secas).

Las vacas se encuentran en estabulación, cuentan con comederos, bebederos y sombreaderos. La alimentación consta de heno de alfalfa, ensilado de maíz, paja, alimento concentrado preparado especialmente para las necesidades del hato, bagazo de cervecería, sales minerales (magnafoscal), grasa de sobrepaso, bicarbonato de sodio y absorbentes de micotoxinas. Las vacas son ordeñadas dos veces al día.

Se utilizó un hato de 80 vacas Holstein clínicamente sanas, seleccionadas previamente, dependiendo de la etapa productiva en que se encontraban, se dividieron en 10 grupos de 8 vacas cada grupo, 1 a 9 meses de gestación (Grupo 1 al 9) y el último grupo con vacas de 10 días después de parir (Grupo 10).

2.3 Toma de muestras

Se obtuvo una muestra de sangre de la vena coccígea de cada vaca (8 mL), con tubo vacutainer con anticoagulante EDTA, las cuales se mantuvieron en refrigeración hasta su análisis. Las muestras fueron centrifugadas a 2000 rpm durante 10 minutos para obtener plasma y se almacenaron en tubos Eppendorf a -25°C, su análisis se realizó en el laboratorio del Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM para determinar los indicadores de estrés oxidativo.

2 Análisis de muestras para identificación de estrés oxidativo

Capacidad Antioxidante

La capacidad antioxidante se midió mediante la prueba de poder antioxidante por reducción férrica (FRAP) de acuerdo al método de Benzie y Strain (1999).

Esta prueba se basa en una reacción de óxido-reducción, en la cual los antioxidantes impiden la oxidación de un sustrato, en donde el oxidante se reduce a expensas del antioxidante. La prueba exceptúa a los antioxidantes que actúan mediante quelación o desactivación enzimática. Los antioxidantes presentes en una muestra reducen al Fe [III] en un medio ácido transformándolo en Fe [II], el cual en presencia de 2,4,6-tripiridil-s-triazina forman un complejo de color azul cuya absorbancia se puede medir en el espectrofotómetro a 593 nm.

Alícuotas de 50 μ L se tomaron por duplicado de cada muestra; a cada una se les agregó 1.5 mL de una mezcla formada por una solución amortiguadora de acetato 300 mM a pH 3.6, una solución acuosa de cloruro férrico hexahidratado (Fe [III]) 200 mM y 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) 10 mM (disuelto en HCl 40 mM) en una relación 10:1:1 respectivamente. Las muestras se incubaron en agitación a 37°C por 15 minutos y se obtuvieron sus absorbancias en un espectrofotómetro a 593 nm. Las muestras se protegieron de la luz todo el tiempo debido a que el TPTZ es sensible a esta. Se realizaron curvas patrón con soluciones acuosas de FeSO₄ a diferentes concentraciones (0.2 – 3.2 mM), los resultados se presentan en nmol de Fe [II] formados por mL de muestra.

Lipoperoxidación

Ésta se midió mediante la prueba de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) de acuerdo al procedimiento descrito por Ohkawa *et al.* (1979).

El MDA es un producto secundario de la oxidación de los ácidos grasos de tres o más dobles ligaduras, que reacciona con el ácido tiobarbitúrico en un medio ácido a altas temperaturas. El producto de la reacción tiene un color rosa-naranja que absorbe luz entre 532 y 535 nm. Es importante precisar que existen otros aldehídos, producidos en la oxidación de ácidos grasos, que al igual que el MDA reaccionan con el ácido tiobarbitúrico, por lo que en conjunto se les llama TBARS (Hoyland y Taylor, 1991).

Alícuotas de 100 μ L se tomaron por duplicado de cada muestra; a cada una se les agregó 1 mL de ácido tiobarbitúrico al 0.8% en solución acuosa y 2 mL de ácido acético al 20% con un pH de 2.5. Las muestras se colocaron en agua en ebullición por un periodo de 60 min, al término de este se enfriaron con hielo durante 5 minutos.

Posteriormente se agregaron 5 mL de n-butanol a cada muestra, se agitaron vigorosamente por 12 segundos, en seguida se centrifugaron a 4000 rpm por un lapso de 10 minutos. Los sobrenadantes se leyeron en un espectrofotómetro a 532 nm para obtener sus absorbancias. La

concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico en las muestras se calculó usando curvas patrón de MDA (entre 10 y 80 μM). El MDA se obtuvo de la hidrólisis de 1,1,3,3 tetraethoxipropano en HCl 0.1 N durante 12 horas a temperatura ambiente (Gutteridge, 1975); una molécula de 1,1,3,3 tetraethoxipropano produce 1 molécula de MDA, por lo que la molaridad se mantiene (Lawrence *et al.*, 1979). Los resultados se reportaron en nmol de malondialdehído por mL de muestra (nmol MDA / mL).

Actividad de la glutatión peroxidasa

La actividad de la glutatión peroxidasa se realizó utilizando el método descrito por Lawrence y Burk (1976).

La actividad de la glutatión peroxidasa, presente en una muestra biológica, se determina mediante el acoplamiento de dos reacciones. En la primera reacción la glutatión peroxidasa (GSH-Px) presente en la muestra cataliza la transformación de glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG) utilizando peróxido de hidrogeno (H_2O_2) como segundo sustrato. En la segunda reacción, el GSSG es restaurado a GSH por acción de la glutatión reductasa (GRc) con el consumo de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida (NADPH). De este modo la desaparición de NADPH es proporcional a la concentración de GSSG formado y dependiente de GPx de la muestra.

Alícuotas de 100 μL se tomaron por duplicado de cada muestra; a cada una se les agregó 800 μL de una mezcla formada por solución amortiguadora de fosfatos 50 mM a pH 7.0 con EDTA 1 mM y NaH_3 1 mM, GSH 1 mM, glutatión reductasa 1U/mL y NADPH. Las pruebas y los controles se incubaron a temperatura ambiente 5 minutos y luego se les agregaron 100 μL de H_2O_2 2.5 mM. La absorbancia se leyó a 340 nm en los 0 y 5 minutos. El coeficiente de absorción molar del NADPH es de 6.22×10^3 y se empleó para los cálculos. Los resultados se presentan en nmol por mL de plasma.

Ácido Ascórbico (Vitamina C)

Para medir la concentración de vitamina C se utilizó la técnica colorimétrica empleando el reactivo de Folin descrito por Jagota y Dani (1982). Las concentraciones de ácido ascórbico fueron medidas por duplicado. A 200 μL de suero se le adicionó 800 μL de ácido tricloroacético y se agitó vigorosamente. La mezcla se mantuvo en agua con hielo para completar la desproteinización durante 5 minutos, posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min. Se obtuvo 500 μL de sobrenadante y se diluyó en 2 mL de agua destilada. A continuación se le adicionó 200 μL del reactivo FolinCiocalteu's diluido en una relación 1:10, se agitó y se incubó durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 760 nm. Para los cálculos se realizó una curva patrón con diferentes concentraciones de ácido ascórbico (0-80 nmol). Los resultados se presentan en nmol de vitamina C /mL de plasma.

4 Análisis estadístico

Se realizó un estudio observacional y transversal, en vacas lecheras Holstein, para determinar el estrés oxidativo en plasma a través de los parámetros FRAP, TBARS, actividad de la glutatión peróxidasa y vitamina C (ácido ascórbico). Se utilizó un diseño completamente al azar, los resultados obtenidos de las variables estudiadas fueron sometidos a un análisis de varianza y las medias fueron comparadas por la prueba de Tukey $\alpha = 0.05$ (Kuehl, 2000).

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SigmaPlot 12 (Systat Software Inc., 2012).

El modelo estadístico está representado mediante la siguiente ecuación:

$$Y_{ij} = \mu_i + T_j + \epsilon_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} = la j-ésima observación del i-ésimo grupo de tratamientos, la variable respuesta.

μ = es la media de la i-ésima población en tratamiento.

T_j = efecto del grupo (Grupos 1-10).

ϵ_{ij} = es el error experimental

Los datos para las pruebas de FRAP y vitamina C presentaron una distribución normal y homocedasticidad, realizándose análisis de varianza y comparación múltiple (Tukey). Para TBARS y actividad de la glutatión peroxidasa no presentaron homocedasticidad aplicándoles una prueba no paramétrica (Kruskal-Wallis) y comparación múltiple de medias (Tukey), con un nivel de significancia del 95%.

5 RESULTADOS

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

5.1 CONCENTRACION DE Fe [II] EN PLASMA DE VACAS LECHERAS

En la Figura 1, se muestran los resultados obtenidos de la prueba de FRAP, en donde se observa que en el segundo y cuarto mes de gestación, el poder antioxidante se encontró elevado (1.747 y 1.754 nmol Fe [II] respectivamente); en el grupo de 10 días después de parir, se observó una disminución en su poder antioxidante (1.0876 nmol Fe [II]). En los demás grupos no se observaron diferencias (1.261 nmol a 1.506 nmol Fe [II]), $P < 0.05$.

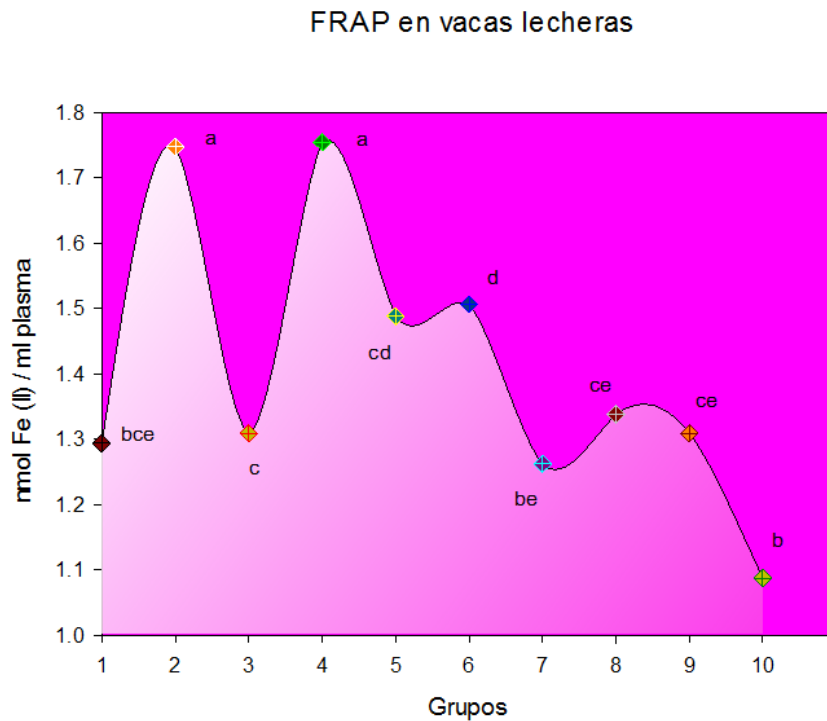


Figura 1. CONCENTRACIÓN DE Fe [II] EN PLASMA DE VACAS LECHERAS
Grupos: 1 (primer mes de gestación), 2 (segundo mes de gestación), 3 (tercer mes de gestación), 4 (cuarto mes de gestación), 5 (quinto mes de gestación), 6 (sexto mes de gestación), 7 (séptimo mes de gestación), 8 (octavo mes de gestación), 9 (noveno mes de gestación), 10 (diez días después de parir). Medias con distinta literal son diferentes ($P < 0.05$).
 $n = 8$.

5.2 NIVELES DE LIPOPEROXIDACIÓN EN PLASMA

En la Figura 2, se muestran los resultados de la prueba de TBARS, en los datos obtenidos se observó un aumento en la lipoperoxidación a partir del cuarto mes hasta los nueve meses de gestación (102.36 – 61.28 nmol MDA); así como en el grupo 10 (111.62 nmol MDA). Se observó una disminución en la lipoperoxidación a partir del primer mes de gestación hasta el tercer mes de gestación (37.48-55.71 nmol MDA). $P < 0.05$.

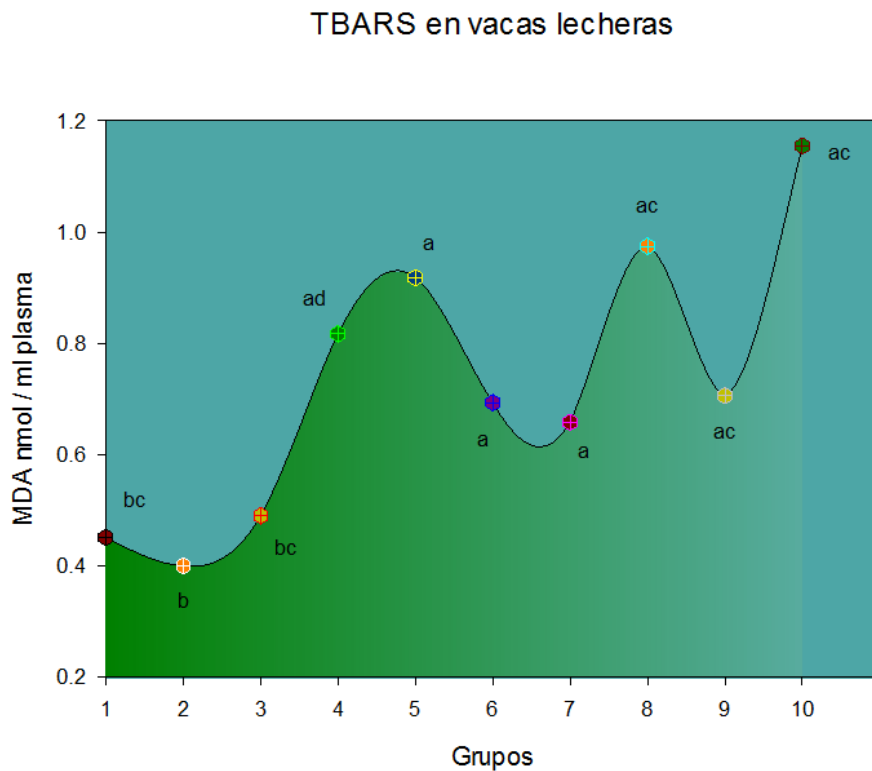


Figura 2. CONCENTRACIÓN DE MDA EN PLASMA DE VACAS LECHERAS
Grupos: 1 (primer mes de gestación), 2 (segundo mes de gestación), 3 (tercer mes de gestación), 4 (cuarto mes de gestación), 5 (quinto mes de gestación), 6 (sexto mes de gestación), 7 (séptimo mes de gestación), 8 (octavo mes de gestación), 9 (noveno mes de gestación), 10 (diez días después de parir). Medias con distinta literal son diferentes ($P < 0.05$). $n = 8$.

5.3 ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA EN PLASMA

En la Figura 3, se presenta la actividad de la enzima glutatión peroxidasa; en donde se observó un aumento en el séptimo mes de gestación (112.40 $\mu\text{mol NADPH}$). No se encontraron diferencias en los demás grupos (10.62 a 57.78 $\mu\text{mol NADPH}$), $P < 0.05$.

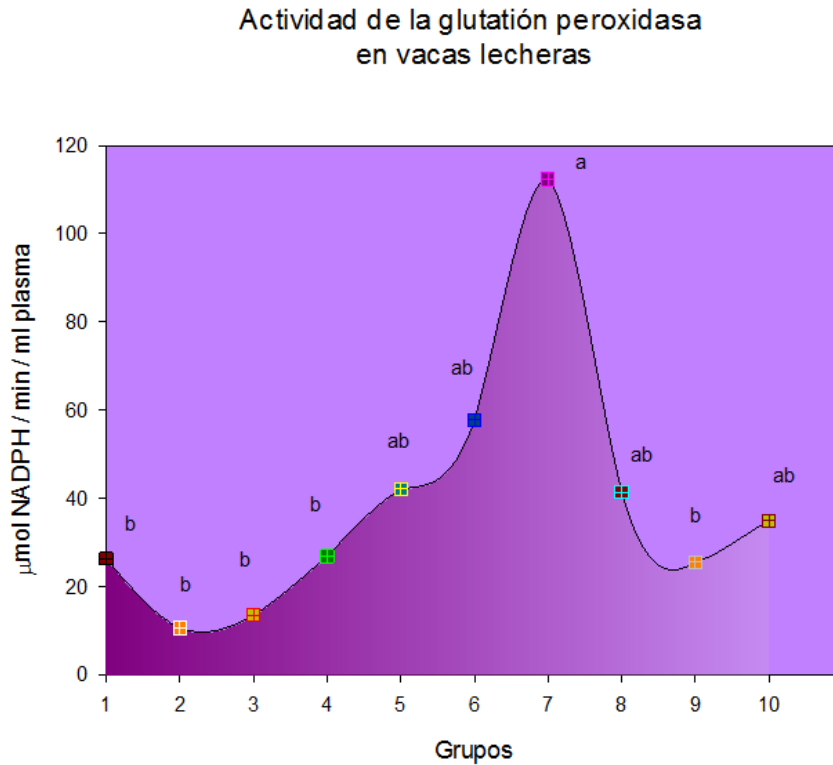


Figura 3. CONCENTRACIÓN DE NADPH EN PLASMA DE VACAS LECHERAS
Grupos: 1 (primer mes de gestación), 2 (segundo mes de gestación), 3 (tercer mes de gestación), 4 (cuarto mes de gestación), 5 (quinto mes de gestación), 6 (sexto mes de gestación), 7 (séptimo mes de gestación), 8 (octavo mes de gestación), 9 (noveno mes de gestación), 10 (diez días después de parir). Medias con distinta literal son diferentes ($P < 0.05$). $n = 8$.

5.4 CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO EN PLASMA

En la Figura 4, se presentan los resultados de vitamina C en donde se observaron valores elevados en los grupos de uno, tres y cinco meses de gestación (75.6, 65.70, 60.41 nmol de vitamina C respectivamente), el valor más bajo se encontró a los 8 meses de gestación (29.07 nmol vitamina C), no se encontraron diferencias en los demás grupos (53.64 a 41.01 nmol vitamina C), $P < 0.05$.

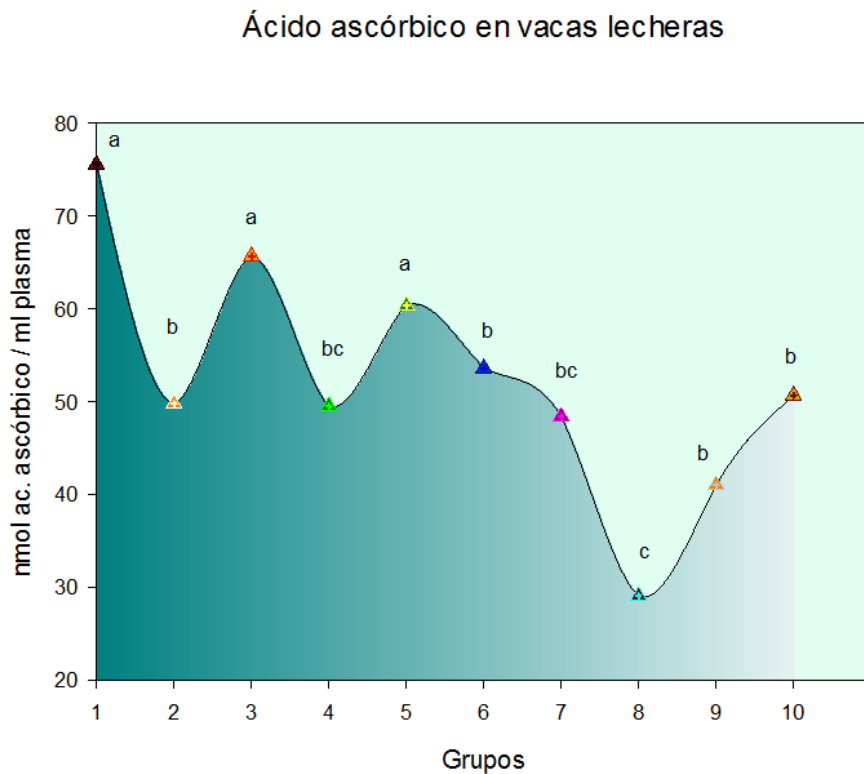


Figura 4. CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO EN EL PLASMA DE VACAS LECHERAS
Grupos: 1 (primer mes de gestación), 2 (segundo mes de gestación), 3 (tercer mes de gestación), 4 (cuarto mes de gestación), 5 (quinto mes de gestación), 6 (sexto mes de gestación), 7 (séptimo mes de gestación), 8 (octavo mes de gestación), 9 (noveno mes de gestación), 10 (diez días después de parir). Medias con distinta literal son diferentes ($P < 0.05$). $n = 8$.

6 DISCUSIÓN

El período comprendido entre el final de la gestación y principios de la lactancia (período de transición) es la etapa más comprometida del ciclo productivo (Gitto *et al.*, 2002). La duración de este período es definido por diferentes autores como las últimas cuatro semanas antes del parto y las primeras cuatro semanas después del parto (Goff *et al.*, 1997). El periodo de transición es especialmente crítico para la salud y el desempeño productivo de las vacas lecheras (Shanks *et al.*, 1981). Las vacas lecheras son susceptibles a desarrollar un cuadro de mastitis durante el periodo de transición, la incidencia de este cuadro está relacionada con cambios en la composición, magnitud y eficiencia del sistema de la glándula mamaria (Sordillo, 2005). Existen numerosos factores genéticos, fisiológicos y ambientales que comprometen el mecanismo de defensa del huésped durante el periodo de transición (Sordillo *et al.*, 2005; Sordillo *et al.*, 2002). La síntesis de leche y su secreción están acompañados de una alta demanda de energía y por lo tanto un incremento en los requerimientos de oxígeno (Gitto *et al.*, 2002; Waller, 2000). Este incremento en la demanda de oxígeno favorece un aumento en la producción de ROS, originando un cuadro de estrés oxidativo (Brzezinska-Slebodzinska and Miller *et al.*, 1994). Al respecto, un incremento en los niveles de TBARS durante el periodo de transición, ha sido reportado por varios autores (Bernabucci *et al.*, 2005; Bouwstra *et al.*, 2008; Miller, Brezezinska-Slebodzinska *et al.*, 1994; Castillo *et al.*, 2000; Castillo *et al.*, 2005), esta información coincide con los resultados de TBARS, obtenidos en este trabajo (Figura 2), situación que confirma la presencia de un cuadro de estrés oxidativo a partir del segundo tercio de la gestación y durante el periodo de transición.

Los sistemas de alimentación basados en forraje verde, mejoran el estado oxidativo del animal debido a su alto contenido de antioxidantes, como la vitamina A, vitamina E y el selenio, los cuales juegan un papel importante en la salud y la producción del animal (Descalzo *et al.*, 2005). Cuando la disponibilidad de forraje es limitada y se suplementa con ensilado, el cual se sabe que es pobre en antioxidantes (Ballet *et al.*, 2000), se favorece el desarrollo de un cuadro de estrés oxidativo. La medición de la capacidad antioxidante en el plasma describe el equilibrio dinámico entre los compuestos pro-oxidantes y antioxidantes, por lo que resulta ser un excelente indicador del bienestar animal (Celi, 2011). En ausencia de valores reportados en la literatura sobre la capacidad antioxidante en rumiantes durante la gestación, los resultados observados en este trabajo sobre el poder antioxidante (FRAP) podrían ser un valor de referencia para evaluar el estado antioxidante del animal. La disminución gradual de la protección antioxidante (FRAP) en el segundo tercio de gestación y cercana al periodo de transición (Figura 1) coincide con el aumento progresivo en el proceso de peroxidación de los lípidos plasmáticos (TBARS) en la vaca lechera (Figura 2), situación metabólica que refleja el desarrollo de un cuadro de estrés oxidativo previo al parto, esta observación coincide con lo reportado por Miller *et al.*, 1993 y Castillo *et al.*, 2005.

El ácido ascórbico es considerado como un biomarcador de estrés oxidativo y es un indicador del estado antioxidante del individuo (Chew, 1993). El ácido ascórbico actúa como un secuestrador de radicales libres y como reductor de los radicales tocoferoxil, restaurando la actividad

antioxidante de la vitamina E. (Chaiyotwittayakun *et al.*, 2002; Bendich, 1992). Por otro lado, en la literatura se menciona, que la adición de ácido ascórbico (vitamina C) a la dieta, aumenta la concentración de inmunoglobulinas plasmáticas en ganado lechero (Blair *et al.*, 1984), y que en la presencia de cuadros de mastitis, los niveles de vitamina C plasmáticos se encuentran disminuidos (Ranjan *et al.*, 2005; Weiss *et al.*, 2004). No hay datos reportados en la literatura sobre los niveles plasmáticos de ácido ascórbico durante el ciclo productivo de la vaca lechera que nos permitan comparar con lo aquí encontrado (Figura 4), sin embargo, este resultado muestra una disminución progresiva a partir del séptimo mes de gestación, condición que sugiere un desgaste en la protección antioxidante del animal.

La enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px) es una metaloenzima que forma parte del sistema glutatión, señalado como el principal sistema antioxidante en el organismo (Ceballos, 1999). La actividad de la GSH-Px contribuye a la defensa oxidativa del tejido animal al catalizar la reducción de hidrógeno y lipoperóxidos, por lo que los valores de su actividad se consideran como un indicador de estrés oxidativo (Flohe, 1973). Así mismo, la actividad de la GSH-Px en plasma ha sido usada como un indicador de los niveles de selenio (Se) en ganado lechero en pastoreo, debido a la alta correlación encontrada entre el Se dietario y la actividad de la enzima (Ceballos, 1998; Santiago *et al.*, 2005; Ceballos *et al.*, 1999, López *et al.*, 1997). Por otro lado, existen varios estudios en los que se reporta una disminución en los niveles plasmáticos de GSH-Px durante el periodo de transición, sugiriendo la presencia de un cuadro de estrés oxidativo en la vaca (Celi *et al.*, 2008; Sordillo *et al.*, 2007; Celi *et al.*, 2010). Estos últimos datos se ajustan a lo observado en este trabajo, con lo cual se confirma el desequilibrio metabólico a favor de los oxidantes alrededor del periparto (Figura 3), sin embargo, se carece de mayor información bibliográfica sobre el comportamiento de la actividad de la enzima durante los primeros meses de gestación y su posible relación con los niveles de selenio en vacas estabuladas.

El conocer la fisiopatología del estrés oxidativo nos permitirá diseñar una terapia específica de antioxidantes. Es necesario ampliar la información sobre el establecimiento de un conjunto de biomarcadores de estrés oxidativo, que nos permita apoyar el tratamiento preventivo en vacas lecheras.

7 CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo se sugiere la inclusión de antioxidantes en la dieta de la vaca lechera a partir del segundo tercio de gestación y hasta el final del periodo de transición, con el propósito de controlar la producción basal de especies reactivas del oxígeno durante este periodo y evitar así, el desarrollo de un cuadro de estrés oxidativo que pudiera ser el responsable de algunas alteraciones metabólicas presentes en el periparto.

7 LITERATURA CITADA

1. Aitken SL, Karcher EL, Gandy JC, VandeHaar MJ, Capuco AV and Sordillo LM. Evaluation of antioxidant and proinflammatory genes expression in bovine mammary tissue during the perparturient period. *Journal of Dairy Science*. 2009; 92:589-598.
2. Allison RD, Laven RA. Effect of vitamin E supplementation on the health and fertility of dairy cows; a review. *Veterinary Record*. 2000; 147:703-708.
3. Aréchiga CF, Ortiz O and Hansen PJ. Effect of prepartum injection of vitamin E and selenium on postpartum reproductive function of dairy cattle. *Theriogenology*. 1994; 41: 1251-1258.
4. Ballet N, Robert JC, Williams PEV. Vitamins in forages. In: D.I.Givens EO, R.F.E. Axford and H.M. Omed (ed). *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition*. Oxon, UK: CABI Publishing, 2000, 399-431.
5. Bell AW and Bauman DE. Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. *Journal of the Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 1997; 2: 265-278.
6. Benzie IFF, Strain JJ Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Method Enzyme* 1999; 299: 15-27.
7. Bendich A. Physiological role of antioxidants in the immune response. *J. Dairy Sci.* 1992; 75(Suppl. I): 264.(Abstr.)
8. Bernabucci U, Ronchi B, Lacetera N, Nardone A. Influence of Body Condition Score on Relationships Between Metabolic Status and Oxidative Stress in Periparturient Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 2005; 88:2017-2026.
9. Bouwstra RJ, Goselink RMA, Dobbelaar P, Nielen M, Newblod JR, van Werven T. The relationship between oxidative damage and vitamin E concentration in blood, milk and liver tissue from vitamin E supplemented and nonsupplemented periparturient heifers. *Journal of Dairy Science*. 2008; 91:977-987.
10. Brezezinska-Slebodzinska, Miller JD, Quigley III, Moore JR, Madsen FC. Antioxidant status of dairy cows supplemented prepartum with vitamin E and selenium. *Journal Dairy Science*. 1994; 77:3087-3095.
11. Campbell, MH and Miller JK. Effect of supplemental dietary vitamin E and zinc on reproductive performance of dairy cows and heifers excess iron. *Journal of Dairy Science*. 1998; 81:2693-2699.
12. Castillo C, Benedito JL, López- Alonso M, Miranda M, Hernández J. Importancia del estrés oxidativo en ganado vacuno: en relación con el estado fisiológico (preñez y parto) y la nutrición. *Arch Med Vet*. 2000; 33(1).
13. Castillo C, Hernández J, Bravo A, López-Alonso M, Pereira V and Benedito JL. Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. *The Veterinary Journal*. 2005; 169:286-292.

14. Castrejón SM. Radicales libres y sistema antioxidante. En: McKee T, McKee JR Bioquímica. Las bases moleculares de la vida 4ª ed. México: Mc Graw- Hill, 2009:611-628.
15. Ceballos AF, Witter PA, Contreras A. Actividad sanguínea de glutatión peroxidasa en rebaños lecheros a pastoreo: variación según edad y época del año. Arch Med Vet 1998; 30:13-22.
16. Ceballos AF, Witter PA, Contreras A, Quiroz E, Bohmwald AL. Actividad de Glutatión Peroxidasa en Bovinos Lecheros a Pastoreo Correlacionada con la Concentración Sanguínea y Plasmática de Selenio. Pesq. agropec. bras., Brasília. 1999; 34:12, 2331-2338.
17. Celi P. Biomarkers of oxidative stress in ruminant medicine. Immunopharmacology and Immunotoxicology. 2011; 33: 233-240.
18. Celi P, Di Trana A, Quaranta A. Metabolic profile and oxidative status in goats during the peripartum period. Aust J Exp Agric.2008; 48: 1004–1008.
19. Celi P, Di Trana A, Claps S. Effects of plane of nutrition on oxidative stress in goats during the peripartum period. Vet. J. 2010; 184: 95–99.
20. Chew PB. Importance of antioxidant vitamins in immunity and health in animals. Anim. Feed Sci. Technol. 1993 ; 59: 103-114.
21. Chaiyotwittayakun A, Erskine RJ, Bartlett PC, Herd T.H, Sears PM, Harmont RJ. The effect of ascorbic acid and L-histidine therapy on acute mammary inflammation in dairy cattle. Journal of Dairy Science 2002; 85, 60–67.
22. Descalzo AM, Insani EM, Biolatto A, Sancho AM, García PT, Pensel NA, Josifovich JA. Influence of pasture or grain-based diets supplemented with vitamin E on antioxidant/oxidative balance of Argentine beef. Meat Sci. 2005; 70: 35–44.
23. Esterbauer H Striegl G Puhl H. Rotheneder M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. Free Res Commun 1989;6:67-75.
24. Flohe, L., Günzler, W.A., Schock, H.H. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. FEBS Lett. 1973; 32: 132–134.
25. Frankel EN. Recent advance in lipid oxidation. J Sci Food Agric 1991;54:495-551.
26. Gitto E, Reiter RJ, Karbownik M, Tan DX, Gitto P, Barberi S and Barberi I. Causes of oxidative stress in the pre- and perinatal period. Biol. Neonate 2002; 81:146-157.
27. Goff JP and RL Horst. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. J. Dairy Sci. 1997; 80:1260-1268.
28. Gröhn YT, Erb HN, Mc Culloch and Saloniemi. Epidemiology of metabolic disorders of dairy cattle: association among host characteristics, disease and production. Journal of Dairy Science. 1989; 72:1876-1885.
29. Gutteridge JM. The use of standards for Malonyldialdehyde. Annual Biochem 1975; 69:518-526.
30. Halliwell B, Gutteridge JM. Free Radical in biology and medicine. 3er ed New York: Oxford Press, 1999.

31. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *AMM J Clin Nutr* 1993; 57 (suppl);715S-725S.
32. Halliwell B, Gutteridge JMC. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 1990;280:1-8.
33. Harrison JH, Hancock DD, Conrad HR. Vitamin E and selenium for reproduction in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 1984; 67:123-132.
34. Jagota SK, Dani HM. A new colorimetric technique for the estimation of vitamin C using Folin pphenol reagent. *Analytical Biochemistry* 127; 178-182 (1982).
35. Kuehl RO. *Diseño de Experimentos, Principios estadísticos para el diseño y análisis de investigación*. 2ª ed. México: Thomson Learning, 2000.
36. Lauzon K, Zhao X, Bouetard A, Delbecchi L, Paquette B and Lacasse P. Antioxidants to prevent bovine neutrophil-induced mammary epithelial cell damage. *Journal of Dairy Science* 2005; 88:4295-4303.
37. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat-liver. *Biochem Biophys Res Comm* 1976; 71 (4):952.
38. López-Alonso M, Miranda, Hernández J, Castillo C, Benedito JL Glutathión peroxidasa (GSH-Px) en las patologías asociadas a deficiencias de selenio en rumiantes. *Arch Med Vet* 1997; 29: 171-181.
39. Mallard BA, Dekkers JC, Ireland MJ, Leslie KE, Sharif S, Van Kampen CL, Wagter L, Wilkie BN. Alteration in immune responsiveness during the periparturient period and its ramification on dairy cow and calf health. *Journal of Dairy Science*.1998; 81: 585-595.
40. Miller JK, Brzezinska-Slebodzinska E, Madsen FC. Oxidative stress, antioxidants and animal fuction. *J Dairy Sci* 1993; 76: 2812-2823.
41. Minotti G. Aust SD. The role of iron in the initiation of lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids* 1987;44:191-208.
42. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipids peroxides in animal tissues by Thiobarbituric Acids Reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358.
43. Persson Waller K. Mammary gland immunology around parturition: Influence of stress, nutrition and genetics. *Advances in Experimental Medicine Biology*, 2000; 48: 231-245.
44. Kehrli ME, and Harp JA. Inmunidad en la glándula mamaria. *Veterinary Clinic of North America*. 2003; 17 N° 3: 35-58.
45. Kimura K, Goff JP, Kehrli jr. ME, and Harp JA. Phenotype analysis of peripheral blood mononuclear cells in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 1999; 82:1381-1388.
46. Ranjan R, Swarup D, Naresh R and Patra RC. Enhanced Erythrocytic Lipid Peroxides and Reduced Plasma Ascorbic Acid, and Alteration in Blood Trace Elements Level in Dairy Cows with Mastitis. *Veterinary Research Communications*. 2005; 29: 27-34.

47. Rukkwamsuk T, Kruip TA and Wensing T. Relationship between overfeeding and overconditioning in the dry period and the problems of high producing dairy cows during the postparturient period. *Veterinary Quarterly*. 1999; 21: 71-77.
48. Saad AM, Concha C and Astrom G. Alteration in neutrophil phagocytosis and lymphocyte blastogenesis in dairy cows around parturition. *Journal of Veterinary Medicine series B*. 1989; 36: 337-345.
49. Sartorelli, P., Paltrinieri, S., and Agnes, F. 1999. Non-specific immunity and ketone
50. Santiago J, Villa NA, Pineda AF, Gallego AB, Tabares P, Ceballos A. Actividad sanguínea de superóxido de dismutasa y glutatión peróxidasa en novillas a pastoreo. *Pesq. agropec. bras., Brasília*. 2005; 40:11, 1115-1121.
51. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (MX). Programa Nacional Pecuario [Internet]. México: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (MX). Programa Nacional Pecuario 2007-2012 [citado 2012 junio] Disponible: www.sagarpa.gob.mx
52. Seegers H, Fourichon C, Beaudeau F. Production effects related to mastitis economics in dairy cattle herds. *Veterinary Research*. 2003; 34: 475-491.
53. Shanks RD, Freeman AE and Dickinson FN. Postpartum distribution of costs and disorders of health. *J. Dairy Sci.* 1981; 64:683.
54. Smith KL, Harrison DD, Todhunter DA, Conrad HR. Effect of vitamin E and selenium supplementation on incidence of clinical mastitis and duration symptoms. *Journal of Dairy Science* 1984; 67:1293-1300.
55. Sordillo LM. Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Livestock Production Science*. 2005; 98: 89-99.
56. Sordillo LM and Aitken SL. Impact of oxidative stress on health and immune function in dairy cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2009; 128:104-109.
57. Sordillo LM, Contreras GA, Aitken SL. Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows. *Animal Health Research Reviews*. 2009; 10:53-63.
58. Sordillo LM, O'Boyle N, Gandy JC, Cori CM and Hamilton E. Shift in thioredoxin reductase activity and oxidant status in mononuclear cells obtained from transition dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 2007; 90:1186-1192.
59. Sordillo, LM, Streicher KL. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia*. 2002; 7: 135– 146.
60. Sordillo, L.M., Streicher, K.L., Mullarky, I.K., Gandy, J.C., Trigona, W., Corl, C.M. Selenium inhibits 15-hydroperoxyoctadecadienoic acid induced intracellular adhesion molecule expression in aortic endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med*. 2008; 44: 34–43.
61. SigmaPlot 11 Systat Software Inc. (version 11 ed), San Jose CA, 2008.

62. Tappel AL. Will Antioxidant nutrients slow the aging process? *Geriatrics* 1968;23:97-105.
63. Vázquez-Añón M, Nocek J, Bowman G, Hampton T, Atwell C, Vazquez P, Jenkins T. Effects of feeding a dietary antioxidant in diets with oxidized fat on lactation performance and antioxidant in status of cow. *Journal of Dairy Science*. 2008; 91:3165-3172.
64. Waller KP. Mammary gland immunology around parturition. Influence of stress, nutrition and genetics. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2000; 480: 231–245.
65. Walling C. The nature of the primary oxidants in oxidations mediated by metal ions. In: King TE, Manson HS, Morrison M. eds. *Proceedings of the 3rd International Symposium on Oxidases and Related Redox System*. Oxford: Pergamon Press. 1982:85-97.
66. www.tizayuca.gob.mx
67. Weiss WP, Hogan JS, Smith KL. Changes in vitamin C concentrations in plasma and milk from dairy cows after an intramammary infusion of *Escherichia coli*. *Journal of Dairy Science*. 2004; 87:32-37.
68. Weiss WP, Hogan JS, Todhunter DA, Smith KL. Effect of vitamin E supplementation in diets with a low concentration of selenium on mammary gland health of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 1997; 80:1728-1737.

8 Anexo

Cuadro 1. CONCENTRACIÓN DE Fe [II] EN PLASMA DE VACAS LECHERAS

ETAPA PRODUCTIVA	Niveles de nmol de Fe (II)/ml plasma
1 mes de gestación	1.293 ^{bce}
2 meses de gestación	1.747 ^a
3 meses de gestación	1.308 ^c
4 meses de gestación	1.754 ^a
5 meses de gestación	1.488 ^{cd}
6 meses de gestación	1.506 ^d
7 meses de gestación	1.261 ^{be}
8 meses de gestación	1.337 ^{ce}
9 meses de gestación	1.309 ^{ce}
10 días después de parir	1.0876 ^b

Todos los valores están expresados en medias, n=8 para cada grupo.
Medias con distinta literal son diferentes (P< 0.05).

Cuadro 2. NIVELES DE LIPOPEROXIDACIÓN EN PLASMA DE VACAS LECHERAS

ETAPA PRODUCTIVA	Niveles de MDA nmol/ml en plasma
1 mes de gestación	0.451 ^{bc}
2 meses de gestación	0.399 ^{bc}
3 meses de gestación	0.49 ^{bcd}
4 meses de gestación	0.817 ^{ad}
5 meses de gestación	0.918 ^a
6 meses de gestación	0.693 ^a
7 meses de gestación	0.658 ^{ac}
8 meses de gestación	0.974 ^a
9 meses de gestación	0.705 ^{ac}
10 días después de parir	1.155 ^a

Todos los valores están expresados en medias, n=8 para cada grupo.
Medias con distinta literal son diferentes (P< 0.05).

Cuadro 3. ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA EN PLASMA DE VACAS LECHERAS

ESTADO PRODUCTIVO	$\mu\text{mol NADPH}/\text{min}/\text{l plasma}$
1 mes de gestación	26.31 ^b
2 meses de gestación	10.62 ^b
3 meses de gestación	13.49 ^b
4 meses de gestación	26.84 ^b
5 meses de gestación	42.10 ^{ab}
6 meses de gestación	57.78 ^{ab}
7 meses de gestación	112.40 ^a
8 meses de gestación	41.38 ^{ab}
9 meses de gestación	25.52 ^b
10 días después de parir	34.90 ^{ab}

Todos los valores están expresados en medias, n=8 para cada grupo.
Medias con distinta literal son diferentes (P< 0.05).

Cuadro 4. CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO EN PLASMA DE VACAS LECHERAS

ETAPA PRODUCTIVA	nmol de ácido ascórbico/ml en plasma
1 mes de gestación	75.6 ^a
2 meses de gestación	49.80 ^{bc}
3 meses de gestación	65.70 ^a
4 meses de gestación	49.52 ^{bc}
5 meses de gestación	60.41 ^a
6 meses de gestación	53.64 ^b
7 meses de gestación	48.42 ^{bc}
8 meses de gestación	29.07 ^c
9 meses de gestación	41.01 ^{bc}
10 días después de parir	50.70 ^b

Todos los valores están expresados en medias, n=8 para cada grupo.
Medias con distinta literal son diferentes (P< 0.05).