



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CAUSAS DE ABORTO, PARTO PREMATURO Y MUERTE NEONATAL EN
GANADO BOVINO EN PASTOREO EN SOTO LA MARINA TAMAULIPAS

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

MVZ, MARA ALEJANDRA LEÓN ESQUIVEL

TUTOR

MVZ MSc. RENE ROSILES MARTÍNEZ. FMVZ. UNAM.

COMITÉ TUTORAL

MVZ. M.Sc. Dra. ALINE SCHUNEMANN de ALUJA. UNAM

MVZ DR. ROBERTO MONTES DE OCA JIMÉNES.

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE 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.

CAUSAS DE ABORTO, PARTO PREMATURO Y MUERTE NEONATAL EN GANADO BOVINO EN PASTOREO EN SOTO LA MARINA TAMAULIPAS

MVZ. Mara Alejandra León Esquivel. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México.

Resumen Las muertes perinatales con nefroxalosis de bovinos tienen un impacto económico detrimental en la ganadería, por lo que su correcto diagnóstico es necesario. La nefroxalosis se puede deber al consumo de plantas con concentraciones de ácido oxálico arriba del 14 % o, a la síntesis de ácidos glicólico y oxálico por un daño en la actividad de la enzima glicina sintetasa (humanos). Para la identificación de la causa de la muerte perinatal de becerros en un rancho de Soto la Marina Tamps. se practicó la histopatología del riñón, hígado, encéfalo e intestino sin resultados positivos. El oxalato en los órganos de los becerros de muerte perinatal, forraje y malezas de la zona de pastoreo de las vacas se midió por Espectrometría de absorción atómica. Esta concentración estuvo entre el 2 y 6 %, que resultó no significativa para el diagnóstico de intoxicación. Al comparar el número de los cúmulos de cristales birrefringentes entre los becerros muertos con los sanos se identificó una diferencia estadística significativa. Conjuntamente se identificó por la prueba de ELISA la respuesta serológica negativa de los anticuerpos de enfermedades bovinas infecciosas abortivas. Por lo que se descartó la causa infecciosa. Con el fin de identificar la posible insuficiencia de la enzima responsable de la formación de la glicina, se midieron el ácido oxálico y glicólico (medido este último por su reacción con el ácido cromotrópico) en el hígado y riñón preservados en formol de los becerros muertos. En el estudio del glicolato no se logró identificar una concentración diferente estadística significativa entre los becerros enfermos y los sanos. Las muestras preservadas en formol no son las adecuadas para medir el glicolato. Como evidencia de la nefrosis oxálica se tiene la identificación histológica de los cristales birrefringentes en el nefrón. Se realizó la extracción del DNA en las muestras en formol para identificar el parentesco y la alteración en el gen que codifica para la enzima Alanin: glioxalatoaminotransferasa sin resultados definitivos. Lo más sobresaliente de este estudio fue la localización de los cristales de oxalato de calcio en los tubulos convolutados proximales del nefron de los becerros enfermos.

Abstract

Calves perinatal deaths are detrimental effects in livestock production, a precise diagnosis of its cause is needed. Calcium oxalate crystals nephrosis has been associated with perinatal deaths. This nephrosis may be due to: oxalates consumption from plants which have either 14 % or higher oxalate content. In order to diagnosis the cause of either aborted or perinatal death at a Soto La Marina Tamaulipas farm; microscopic tissues changes, tissues and forage oxalate analysis; blood serum antibodies titration for abortive infectious disease were conducted. Once calcium oxalate nephrosis was histological seen, the source of calcium oxalate nephrosis was investigated by the following protocol: calcium oxalates crystals deposite in calves kidney tubules may well come from oxalic acid synthesis because glycine synthetasa failure. This enzyme deficiency has been described in humans as a cause of primary hyperoxaluria. Oxalate concentration in forrages and herbs was lower than 5 %, so this finding eliminates the possibility of caws feed as a source of dead calves with oxalic nefrosis. Oxalate crystals nephrosis in proxymal convoluted tubules in dead calves were identified histological, by its birefringency with polarized light illumination. When the number of kidney birefringent crystals in aborted and perinatal dead calves were compared to healthy calves, a statistical significant difference was seen. Simultaneously, antibodies of abortive infectious bovine diseases were measured by ELISA tests, which resulted negative. Formalized kidney glycolic (reactive to chromotropic acid) and oxalic acid levels were measured in order to associate them to a glicine syntethase enzyme failure. No significant statistical difference in liver and kidney formalized samples analysed for glycolic and oxalic acid levels were seen when compared sick and healthy calves. When DNA analysis in formaline fixed liver calves was assayed to look for relationship among calves was not acomplised. The most outstanding finding in perinatal deaths calves, was that calcium oxalate birefringent crystals in proximal convoluted nephron tubules were observed.

CONTENIDO

Resumen.....	II
Abstract.....	III
Lista de cuadros y de figuras.....	IV
I.-Introducción.....	1
I.1.-Antecedentes de la ganadería a en México.....	3
I.2.-Importancia de la carne de bovino.....	4
I.3.-Tipos de fallas reproductivas.....	7
I.3.2.-Dignosticos de la causa de abortos.....	8
I.3.3.-Principales enfermedades abortivas bovinas.....	10
I.3.4.-Nefrosis oxálica como causa de aborto	13
I.3.5.-Hiperoxaluria primaria.....	15
I.4.-Justificacion, hipótesis, objetivos.....	17
II.-Material y métodos.....	18
II.1.-Lugar de estudio.....	18
II.3.-Estudio Histopatología.....	18
II.4.-Estudio bajo la luz polarizada y conteo de cristales de oxalato.....	18
II.5.-Prueba de ELISA.....	19
II.6.-Muestreso de pastoreos y hierbas.....	19
II.7.-Metodo para la determinación de ácido oxálico.....	20
II.8.-Metodo para la determinación de glicolato.....	21
II.9.-Metodo de la obtención DNA/RNA de tejido fijado en formol al 10% enveido en parafina (FFPE).....	21
II.10.-Análisis estadístico.....	22
III.-Resultados.....	23
III.1.-Prueba de Elisa.....	23
III.2.-Estudio histopatológico.....	24

III.3.-Concentracion de ácido oxálico y cristales en tejido renal.....	26
III.4.-Valores de ácido oxálico y cristales de tejido renal.....	27
III.5.-Concentracion de glicolato en tejido renal.....	28
IV.-Discusión.....	30
IV.1.-Nefrosis oxálica por daño metabólico.....	30
IV.2.-Nefrosis oxálica por consumo.....	30
IV.3.- Concentración de ácido oxálico en tejido renal.....	31
IV.4.-Presencia de cristales.....	31
IV.5.-Resultados de la prueba de ELISA.....	31
V.-Conclusiones.....	33
VI.-Referencias.....	34

Lista de cuadros

Cuadro 1. Principales enfermedades abortivas	¡Error! Marcador no definido.
Cuadro 2.	23
Cuadro 3. Concentraciones de ácido oxálico de los pastos de las praderas del rancho “La Esperanza” y el pasto en paca suplementado en la dieta.	27
Cuadro 4. Determinación de ácido oxálico en malezas que se encontraron en las praderas del rancho “La Esperanza”	28

Lista de figuras

Figura 1. Producción de ganado en pie de Bovino	4
Figura 2. TMAC del Volumen de producción y valor de la producción de carne en canal en México.....	5
Figura 3. Producción de carne en canal de bovino.....	6
Figura 4. Corte histológico de riñón de feto abortado bajo luz polarizada donde se presentan los cristales de oxalato en los tubulos convolutados proximales.....	25
Figura 5. Corte histológico de un riñón de feto de los casos clínicos y uno del grupo control.....	26
Figura 6. Concentraciones de oxalato de calcio y conteo de cristales en tejido renal de fetos testigo y del caso clínico.....	27
Figura 7. Concentraciones de glicolato en tejido renal de fetos testigos y fetos de los casos clínicos.....	30

I.- introducción.

Los abortos en la producción bovina limitan el crecimiento de las explotaciones ganaderas ya que afectan la capacidad de producción y la cantidad de crías. Se ha notificado que por cada aborto los productores pierden entre \$600 y \$ 1000 dólares (Peter, 2000). Otro estudio muestra que por brote de aborto por Diarrea Viral Bovina (DBV) se pierden por lo menos \$100, 000 dólares, lo que muestra el impacto económico que tienen los abortos en la ganadería (Houe, 2003).

Los casos de aborto se pueden presentar en forma esporádica, endémica o en forma de brote y pueden ser de origen infeccioso y no infeccioso, por lo que establecer el agente causal es laborioso. El trópico húmedo del Golfo de México es una de las principales zonas ganaderas de nuestro país por lo que los abortos, partos prematuros y muertes neonatales del ganado bovino en esta zona constituyen pérdidas importantes en la producción nacional de ganado bovino (Avila 1995, Barajas 1988, Rivera 2001, Segura-Correa 2009).

Por esto, se realizó el estudio en el rancho “La Esperanza” que se ubica en Soto La Marina, Tamaulipas el cual es representativo de la región del trópico húmedo del Golfo de México. Este rancho se dedica a la producción de pie de cría de ganado Limousine, en el cual se han presentado casos de abortos en vacas en el último tercio de gestación. Estudios previos de estos casos en el rancho “La Esperanza” indican, que una de las causas posibles es la nefrosis oxálica en el feto.

La nefrosis oxálica se ha relacionado como una causa de aborto y muerte neonatal en bovinos. Se realizó un estudio donde se identificaron las diferentes causas de abortos en bovinos en un periodo de 2 años, en este se encontraron que de 328 casos en que la etiología del aborto no fue establecida, 175 de ellos fueron positivos a cristales de oxalato en el riñón del feto, condición asociada con los abortos en rumiantes (Schiefer 1974). La nefrosis oxálica se puede derivar del consumo de con alto contenido de ácido oxálico. El oxalato al ser consumido es absorbido rápidamente por el sistema gastrointestinal, posteriormente se metaboliza en el hígado principalmente, donde es oxidado a glicolaldehído por la enzima alcohol deshidrogenasa. Luego, este glicolaldehído es oxidado a glicolato por la enzima aldehído deshidrogenasa mitocondrial. La oxidación de glicolato

a glioxalato es un paso en el cual se retrasa el metabolismo al permitir la acumulación de altas concentraciones de glicolato en suero. Una vez formado el glioxalato, se transforma rápidamente en oxalato, el cuál forma cristales al unirse al calcio sanguíneo, los cuales se depositan principalmente en los túbulos convolutados renales proximales (White 1973, García 2006).

El oxalato es un metabolito en plantas y animales que se encuentra unido al sodio y potasio, o en forma insoluble unido a calcio. La concentración de ácido oxálico en las plantas varía con la especie así como con la edad, estación y clima. En algunas plantas la mayor concentración es en la etapa de crecimiento ya que es mayor la fotosíntesis. En la fotosíntesis se producen varios metabolitos los cuales son precursores del ácido oxálico. Este ácido oxálico de sodio y potasio contenido en las plantas al ser consumido por los animales en altas concentraciones, se absorbe en el tracto gastrointestinal y pasa al torrente sanguíneo donde se une al calcio y forma cristales de oxalato de calcio los cuales son insolubles y se acumulan en diferentes órganos, principalmente en los túbulos renales proximales causando obstrucción y nefrosis (Shupe, 1967).

Por otro lado existe un desorden metabólico en humanos llamado hiperoxaluria que se debe a un daño autosómico recesivo en el metabolismo de la glicina y ocurre en el peroxisoma hepático por falta de la enzima alaninoglicolato aminotransferasa. Esta enzima es la encargada de metabolizar el glioxalato en glicina y la deficiencia provoca la producción de glicolato y oxalato. El oxalato forma cristales al unirse al calcio sanguíneo, mismos que se acumulan en los tejidos. Dado que el oxalato de calcio es eliminado por vía renal, el riñón y los órganos con capilares como el encéfalo son los primeros órganos, causando la oxalosis obstructiva en el riñón nefrosis oxálica o hasta traumatismo de la pared vascular (Lorenzo 1996).

I.1 Antecedentes de la ganadería en México.

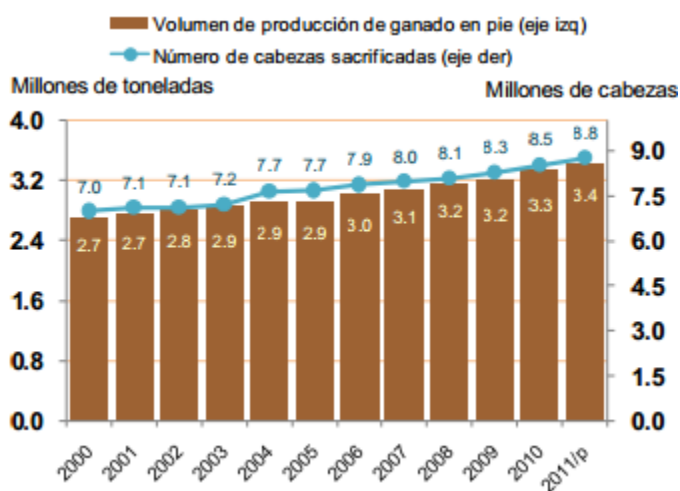
La ganadería vacuna en México se inicia con la introducción de ganado bovino a América por parte de los españoles, alrededor del año de 1524. Durante la época de la colonia, se establecieron límites y derechos para la posesión de la tierra, dando origen a las "Estancias" que es la primera etapa en la creación de la "Hacienda" a través de los años, la cual existió hasta la época posrevolucionaria. Los esquemas productivos y comerciales que provocaron un crecimiento importante de la ganadería extensiva, de 1542 a 1810,

fueron las grandes extensiones de explotaciones ganaderas que se establecieron cerca de las ciudades, con el fin de suministrar alimentos a la población (SIAP Sagarpa 2012).

Los movimientos sociales que culminaron con la revolución de 1910, limitaron la consolidación de la ganadería bovina en México. En el siglo XX, la introducción de nuevas técnicas para la crianza del ganado y la transformación industrial de los años 40, son los principales factores que permitieron la consolidación de la ganadería bovina mexicana. La expansión de la ganadería para carne empieza en las zonas tropicales del país, seguida de un proceso de población ganadera en el norte del territorio, el cual ha estado estrechamente ligado al mercado exterior. Paulatinamente, el hato ganadero, inicialmente criollo, se ha ido matizando con animales de razas provenientes de Estados Unidos de América Brasil y Europa. Entre estas destacan razas como la charolais, angus, hereford, simmental y diversas variedades cebuínas como la brahman, indobrasil, guzerat y gyr. En las zonas tropicales, el cruzamiento con razas lecheras como la Holstein y la pardo Suizo, generan en gran medida la ganadería de doble propósito del país; sin embargo, en general, la producción de carne de bovino ha evolucionado tecnológicamente a un menor ritmo que la avicultura y la porcicultura (SIAP Sagarpa 2012).

I.2. Importancia de la producción de carne de bovino.

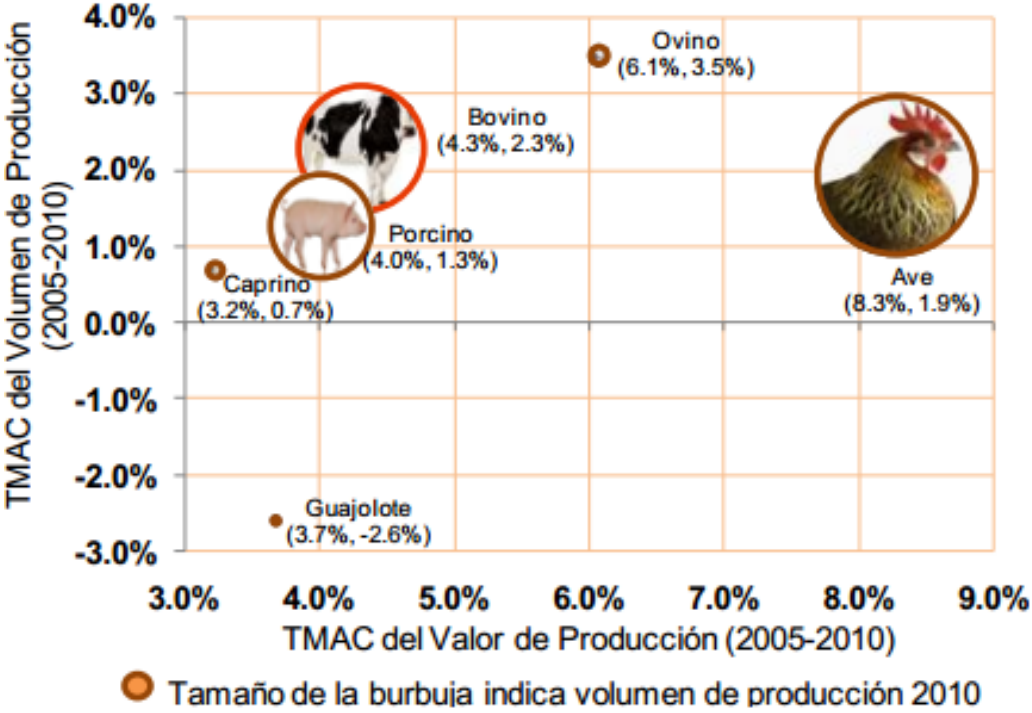
Con la información a continuación se describe parte de la producción y consumo de bovinos en México. Esto da cuenta de la demanda y la necesidad de mantener los sistemas de salud en condiciones óptimas y de producción de la ganadería bovina, para llenar la demanda por los consumidores en México. La producción de carne de bovino en México es trascendental, se realiza aprovechando recursos naturales en más del 50% del territorio nacional. La carne de bovino tiene gran importancia como alimento básico, por la generación de divisas con la exportación de ganado y por su contribución en la generación de empleos. En México, la ganadería bovina es una de las principales actividades agropecuarias, relevante por la variedad de productos obtenidos, como la carne y la leche. En la figura 1 se describe como ha aumentado la producción de cabezas de bovino a través de los años 2001 al 2011. Así mismo se anotan las toneladas obtenidas del número de cabezas de bovino sacrificadas. De acuerdo con el Censo Agrícola, Ganadero y Forestal de 2007, en México existen alrededor de 1.13 millones de unidades de producción de ganado bovino, 10.3% ubicadas en Veracruz, 7.7% en Chiapas, 7.4% en Oaxaca, 6.5% en Guerrero, 6.1% en el Estado de México, 5.5% en Jalisco y el resto en las demás entidades del país. Alrededor del 60% de estas unidades tienen como actividad principal el desarrollo o engorda de bovino. La existencia aproximada de ganado bovino es de 30 millones de cabezas. Entre 8 y 9 millones son sacrificadas anualmente para la producción de carne (Figura 1).



Fuente: Con datos de SIAP-SAGARPA

Figura 1. Producción de ganado bovino en pie y número de cabezas sacrificadas

Es importante comentar que la carne de bovino es la segunda con mayor producción nacional después de la carne de ave en nuestro país, con una participación de 30.5% en la producción total de carne en canal en México, así como del 35.3% del valor generado. Asimismo, contribuye con el 9.2% del volumen de alimento producido en el sector pecuario nacional y con el 23% del valor total pecuario (Figura 2).



Fuente: Con datos de SIAP-SAGARPA

Figura 2, Tasa media anual de crecimiento (TMAC) del volumen de producción de carne en canal de bovino y su relación con las otras especies de animales de consumo en México

Entre el año 2005 y 2010, la producción de ganado en pie de bovino en México se incrementó a una tasa media anual de crecimiento (TMAC) de 2.8%, alcanzando 3.3 millones de toneladas en 2010, con un valor de 59,251 millones de pesos. Se estima que para 2011 llegó a 3.4 millones, un 2.2% de crecimiento respecto al año previo, con un valor de 61,946 millones de pesos, Figura 2. Esta información aquí vertida nos indica la gran demanda de la carne de bovino como alimento de los habitantes de México y señala la necesidad de colaborar en la salud de esta especie animal, para mantener y mejorar la producción, para llenar la demanda (Figura 2)

Por su parte, la carne en canal aumentó en cinco años a una TMAC de 2.3%, alcanzando 1.74 millones de toneladas en 2010, con un valor de 57,954 millones de pesos. Es el segundo tipo de carne con mayor crecimiento anual en volumen después de la carne de ovino en el periodo indicado y el tercero en crecimiento anual de valor, con un promedio de 4.3% entre el año 2005 y 2010, después del crecimiento mostrado por el valor de la carne de ave y de ovino, Figura 2.

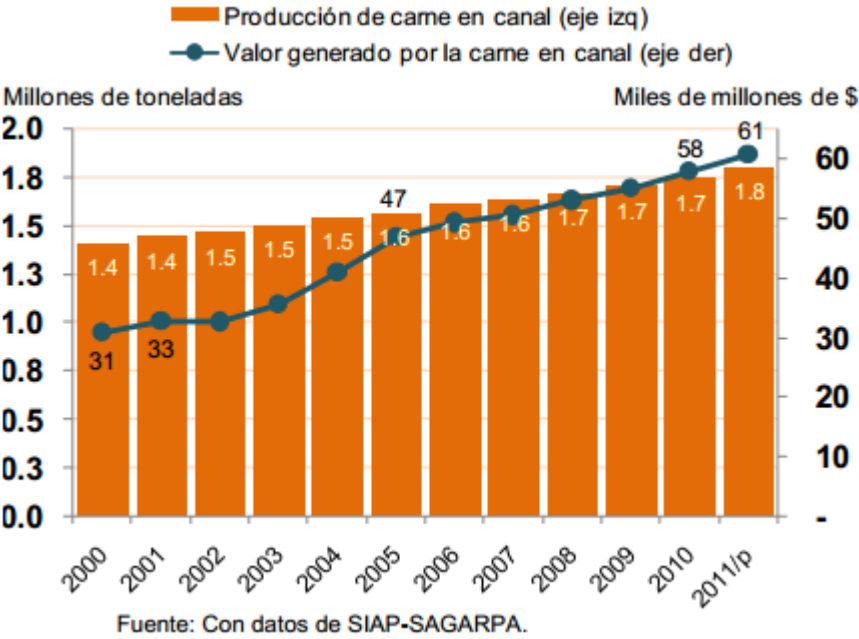


Figura 3. Producción de carne en canal de bovino

Para 2011 (Figura 3) se estima que la producción alcanzó 1.8 millones de toneladas, lo que significa un crecimiento de 3.1% respecto al año anterior. Se considera que el valor generado se ubicó en 60,761 millones de pesos (SIAP/SAGARPA/INEGI, 2012).

I.3 Tipos de fallas reproductivas.

I.3.1 Importancia de los abortos.

Todos los expertos en salud animal coinciden que para disminuir las pérdidas económicas se tiene que implementar programas de salud animal tendientes a disminuir, controlar y en lo posible erradicar las principales enfermedades infecciosas y no infecciosas. Ahora bien, las fallas reproductivas posteriores a la fertilización son los causantes de las mayores pérdidas económicas en la ganadería bovina en todos los países donde se desarrolla esta actividad. Los abortos o fallas reproductivas causan pérdidas económicas importantes y limita el crecimiento de la industria bovina. Se menciona que por cada aborto se pierden entre \$600 y \$1000 dólares (Peter, 2000 y Houe 2003) y son identificadas por la muerte embrionaria o fetal.

La mortalidad embrionaria puede sospecharse en toda hembra sana que retorna al celo post-servicio en fecha cronológica del ciclo estral o después de un plazo superior a la misma. Si se llegara a presentar la muerte embrionaria, esta desencadenaría en la absorción del embrión por la vaca o la expulsión de éste, que sería difícilmente perceptible por su tamaño. La ocurrencia promedio de esta mortalidad es variable y puede afectar a los índices reproductivos entre un 8% hasta más del 40%, al depender de la causa o causas que producen estas muertes embrionarias. La muerte fetal está definida como la pérdida del producto de la fertilización a partir del periodo fetal que comienza el día 46 cuando termina el período embrionario al completarse la diferenciación de estructuras fetales (el producto es llamado entonces feto, en el cuál, la mayoría de los tejidos, sistemas y órganos se encuentran ya formados y la implantación está completa) hasta antes del día 260 de gestación. El resultado de la muerte fetal produce en la hembra: la expulsión fetal (aborto) o la retención fetal. La expulsión fetal (aborto) es cuando el organismo de la vaca reconoce al feto muerto o vivo no viable, como un cuerpo extraño y por consecuencia lo expulsa. En la retención fetal, la razón fundamental por la cual los fetos muertos pueden ser retenidos en el útero es por la persistencia del cuerpo lúteo de la gestación, que hace que el organismo del animal reaccione como si estuviera en gestación. Otro factor que interviene en la retención de los fetos muertos es la desactivación del mecanismo materno-fetal de inducción del aborto. Por consecuencia de la retención fetal se puede producir la momificación fetal o la maceración fetal. La ocurrencia promedio de esta mortalidad puede afectar los índices reproductivos entre un

10% hasta más del 30% dependiendo de la causa o causas que producen estas muertes fetales (Segura-Correa 2009, INIFAP 2003).

I.3.2 Diagnóstico de las causas de aborto.

Una encuesta sobre el aborto basado en el diagnóstico veterinario a nivel de laboratorio revela una variedad de causas, la mayoría asociada a un número limitado de agentes infecciosos. La proporción de aborto bovino atribuida a un agente abortígeno específico puede variar según la región, probablemente debido a diferencias en el clima, tipo de producción, prácticas de manejo, programas de vacunación y población de vida salvaje. El muestreo y los procedimientos a nivel de laboratorio también pueden influir en cuáles son las causas identificadas. Por ejemplo, la Neosporosis ha sido reconocida con la mejora de los procedimientos diagnósticos, (Avila 1995, Barajas 1988, Rivera 2001, Segura-Correa 2009).

Cuadro 1.

Principales enfermedades abortivas en bovinos.

Agente	Enfermedad	Signo	Transmisión	Etapas
Bacteriana	Brucelosis	Aborto y retención placentaria	Contacto directo y monta	A partir de los 6 meses
Bacteriana	Listeriosis	Aborto	Roedores, silo y estrés	De 6 a 9 meses
Bacteriana	Vibriosis	Aborto, ciclo estral repetido y largo	Monta	5 a 6 meses. Muerte del embrión
Viral	DVB: Diarrea Viral Bovina	Diarrea aborto, erosiones en boca y encías	Contacto directo, comida y bebida	Entre 1 y 9 meses de gestación
Viral	RBI: Rinotraqueitis Bovina Infecciosa	Aborto, descargas nasales y pústulas en vagina	Monta y líquidos corporales	Entre 6 y 9 meses
Protozoos	Tricomoniasis	Estros largos, aborto, infertilidad	Monta	2 a 4 meses
Hongos	Micosis	Necrosis en cotiledones y piel del feto, aborto	Oral	de 3 a 7 meses

Fuente: Northeast Irm Manual (2007) e-campo.com, <http://www.e-campo.com/media/news/nl/>

Para el diagnóstico de la causa de aborto es necesario realizar un trabajo analítico completo, donde se incluyen procedimientos de patología macromicroscópica, microbiología, inmunología y de toxicología, disponibles en el laboratorio. La información epidemiológica tal como las circunstancias, la tasa de la frecuencia de abortos, la información clínica como: edad gestacional del aborto, si los fetos son frescos o autolíticos, si hay abortos tanto en vaquillonas como en vacas, si se utiliza servicio natural o inseminación artificial, contribuyen a la identificación de la causa. La serología sanguínea materna de una vaca que ha abortado, puede dar indicios de la exposición a agentes infecciosos, pero usualmente no puede diferenciar entre exposición natural y vacunal, o entre exposición reciente o previa. La serología materna en dos ocasiones, es más útil

cuando se examina el suero de un animal no vacunado o cuando se toman muchos animales para muestreo y cuando se provee una historia clínica detallada de cada animal. Muchas veces cuando no existen signos específicos o lesiones que puedan guiar la selección de qué prueba de diagnóstico utilizar, se emplean como perdigonada protocolos de diagnóstico estándares (Barajas 1998, Segura-Correa 2009).

El envío de un feto entero con placenta y muestras de suero sanguíneo pares, son los mejores elementos, ya que con el título de anticuerpos de acuerdo a la diferencia del 1er con el segundo muestreo será posible conocer la evolución de la enfermedad. La placenta es importante en algunas enfermedades como el aborto micótico y otras varias enfermedades bacterianas, donde la placentitis es la lesión primaria. Un examen completo de necropsia en el feto o en la placenta para buscar alguna lesión macroscópica. Así como el estimado de la edad fetal y el grado de autólisis. Se realizan exámenes de rutina histopatológicos de cerebro, pulmón, corazón, hígado, riñón, adrenales, bazo, timo, nódulos linfáticos, músculo esquelético, abomaso, intestino delgado, colon y placenta (Anderson 1997, Segura-Correa 2009).

I.3.3 Principales causas de aborto.

El virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) es uno de los patógenos ampliamente difundidos en la población bovina del mundo constituyendo una de las causas más importantes de las fallas reproductivas. La infección de un bovino inmunocompetente con el VDVB en el 70 a 90% de los casos resulta en una infección subclínica con una ligera fiebre y leucopenia, seguido por el desarrollo de anticuerpos neutralizantes y recuperación del animal. Algunas veces los animales infectados pueden manifestar ligera depresión, fiebre y leucopenia con descarga óculo-nasal y ocasionalmente presentar erociones en la cavidad bucal. El efecto del virus sobre el producto de la concepción depende del biotipo del virus infectante y del período de la gestación de la vaca pudiendo ocurrir lo siguiente: muerte y reabsorción embrionaria si la infección ocurre desde la concepción hasta los 42 días y la infección entre los 50 a 100 días puede producir muerte y aborto con expulsión o momificación. La infección del feto entre los 100 y 150 días puede ocasionar malformaciones congénitas (ya que en esta etapa está finalizando la organogénesis del

sistema nervioso), nacimiento de terneros débiles, terneros persistentemente infectados (PI) y terneros sanos. Los terneros PI surgen de la infección del feto con el VDVB biotipo NCP, en algún momento antes de los 125 días de edad cuando el feto todavía es inmunocompetente. El ternero PI es portador del virus, mientras vive es incapaz de montar una adecuada respuesta inmune contra el virus presente en su organismo. Estos animales son los reservorios y los principales diseminadores del virus en el hato y pueden desarrollar la enfermedad de las mucosas de curso fatal (INIFAP 2003, Avila 1995, Houe, 1999, Segura-Correa 2009).

La neosporosis es una enfermedad de distribución mundial que afecta a varias especies de rumiantes, perros y caballos. Es una de las principales causas del aborto en el ganado lechero en los Estados Unidos (California), Nueva Zelanda, Holanda, Reino Unido, entre otros. Además del aborto pueden nacer terneros con graves lesiones cerebrales o terneros de apariencia sana, pero infectados congénitamente. El agente causal es el parásito *N. caninum*, reportado en 1984 en perros con miositis y encefalomiелitis pero descrito como *N. Caninum*. Los perros se infectan al alimentarse con tejidos como placenta o fetos abortados conteniendo quistes del parásito. El perro es el hospedero definitivo y excreta los quistes en sus heces que pueden contaminar el agua y alimentos de las vacas. Las vacas entonces se infectan por vía digestiva al ingerir alimento contaminado con quistes. La vaca infectada no muestra signos clínicos, excepto, la pérdida del feto. El aborto puede ocurrir desde los tres meses hasta el final de la gestación pero en los casos que reportamos los fetos fueron abortados mayormente entre 5 a 6 meses de edad. Según la historia de los casos recibidos, aproximadamente un 10% de las vacas tuvieron abortos consecutivos (Avila 1995, Dubey 1999). Aún no se conoce bien la epidemiología de la neosporosis en el Perú; probablemente la infección fue introducida a través de bovinos y/o cánidos importados de países con alta prevalencia de la enfermedad. La primera evidencia serológica de *N. caninum* fue obtenido en bovinos lecheros de un área de Arequipa; posteriormente el parásito fue diagnosticado en vacas que abortaron y en sus fetos en el valle de Lima Perú, recientemente esta siendo diagnosticado en otras áreas ganaderas del país (Anderson 1997, Avila 1995, Dubey 1999, Rivera, 2000).

La brucelosis es una enfermedad infecciosa de gran impacto económico que afecta a los animales y al hombre. Es producida por bacterias del género *Brucella* que comprende

varias especies como: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis* que afectan al bovino, caprino, porcino, caninos y ovinos respectivamente. Datos recientes indican que la prevalencia de la brucelosis no es mayor al 1% en bovinos lecheros de crianza intensiva y semi-intensiva; sin embargo, existen casos esporádicos de abortos por *Brucella* en pequeños criadores no organizados y que constituyen una permanente amenaza para el resto de ganaderos. La bacteria invade el organismo y son fagocitadas por los macrófagos y distribuida a los órganos linfoides donde pueden persistir. Si la vaca está preñada, la bacteria invade la placenta produciendo una severa placentitis e invasión fetal ocasionando el aborto mayormente después del quinto mes de la gestación. Una consecuencia del aborto es la retención de la placenta con la subsiguiente metritis e infertilidad (Dubey 1988, Rivera 2000).

La leptospirosis es una zoonosis económicamente importante por ser causa de abortos, terneros nacidos muertos y pérdida en la producción de leche. La enfermedad es de distribución mundial y es causada por la bacteria *Leptospira*. Actualmente la *Leptospira* ha sido reclasificada en 7 especies de *Leptospiras* patógenas con aproximadamente 200 serovares en base a la diferencia de sus antígenos de superficie. Los signos clínicos dependen del serovar involucrado y de la susceptibilidad del animal. En la leptospirosis se describen dos tipos de hospedadores: los que mantienen a la bacteria en el medio ambiente que son los reservorios y que a menudo son especies silvestres en donde la infección es de tipo subclínica, y los hospedadores incidentales en los cuales la bacteria causa infección que varía desde subclínica hasta aguda. En ambos tipos la bacteria puede ocasionar el aborto, nacidos muertos o nacimientos de terneros débiles. Varios serovariedades de *Leptospira* pueden infectar al bovino aunque la serovariedades Hardjo y Pomona, son ampliamente descritos como endémicos. La prevalencia de uno u otro serovariedad de *Leptospira* pueden ser según la zona geográfica, la especie animal presente y la situación socioeconómica.(Avila 1995, Barajas 1998, Segura-Correa 2009).

La rinotraqueítis infecciosa bovina (RIB) es causada por un virus herpes y está presente a nivel nacional ocasionando mayormente el complejo respiratorio bovino y ocasionalmente el aborto. La bacteria *Campylobacter* sp., y el parásito *Trichomonas foetus* han sido o están siendo eliminados con el uso de la inseminación artificial aunque es posible que persista en algunos lugares del país. Abortos por *Listeria monocitogenes*, *Salmonella* sp. u otras bacterias no abortogénicas pueden ocurrir en forma esporádica y el diagnóstico

está basado en el aislamiento en forma pura de la bacteria y en los datos epidemiológicos sobre el caso (Avila 1995, Barajas 1998, Segura-Correa 2009).

I.3.4 Nefrosis oxálica como causa de aborto.

Se consideran plantas ricas en ácido oxálico cuando el contenido del mismo supera el 5% de materia seca (MS). Para ser potencialmente tóxicas las plantas deben contener no menos del 10% de ácido oxálico en MS, (Kingsbury 1964, Buck 1980, Hodgkinson 1987).

La intoxicación por oxalatos de calcio en rumiantes puede ser causada en parte por el consumo de plantas con un contenido de oxalatos del 6 al 16% (nefrosis oxálica exógena). Los rumiantes pueden consumir cantidades considerables de oxalatos por que se pueden destruir en el rumen o unirse al Ca libre en el rumen y así ser excretados en heces (Talapatra 1984 y Watts 1959).

La degradación ruminal es la primera defensa frente a las toxinas de la dieta, y entre éstas toxinas se pueden incluir a los oxalatos (Allison 1977 y 1981, Reddy 1987, 1984).

Diferentes autores han mostrado evidencias de que el ácido oxálico es degradado por microorganismos del rumen y que esta degradación es más rápida después de un período de adaptación con dietas que poseen un contenido creciente de ácido oxálico (Allison, 1977; Duncan 1997).

Cuando los rumiantes consumen plantas con ácido oxálico, en su tracto intestinal el ácido oxálico puede ser sujeto de varios procesos. Según Watts (1959) y James (1970) puede degradarse por la microflora ruminal o combinarse químicamente con el calcio y hacerse insolubles y por lo tanto no ser absorbidos. Cuando la microflora no es capaz de degradar la totalidad del ácido oxálico, éste se absorbe y pasa a sangre donde se une al calcio y al magnesio para formar los oxalatos insolubles (James 1972 y 1972).

Los cristales de oxalato de calcio pueden precipitarse en diferentes tejidos pero, especialmente en el riñón. Concentraciones de 20-30 mg/dl de oxalato en sangre pueden ser toleradas sin daño al riñón, pero en otros tejidos el oxalato al precipitarse, si puede producir daños mecánicos (Watts, 1952).

Si la cantidad consumida es alta, los oxalatos de sodio o de potasio son absorbidos y pasan a la sangre donde el calcio sustituye al sodio y potasio, lo que afecta el balance de Ca en los tejidos. El ácido oxálico al unirse al calcio del suero sanguíneo se vuelve

insoluble y no es capaz de pasar la barrera hematoplacentaria ya que el diámetro de los cristales es de 10μ . (Osborne 1990).

En la placenta de la vaca, la sangre del feto nunca entra en contacto con la sangre de la vaca; existe intercambio entre el corion de la placenta y el endometrio: esto es con los gases, azúcares, aminoácidos, vitaminas y minerales, pero no de proteínas. Es decir el intercambio se celebra por ruta transcelular, sólo las moléculas hidrofílicas se transportan por canales paracelulares. Lo que significa que son moléculas muy pequeñas, comparadas con el tamaño de los cristales de oxalato de calcio. Esta información define que el paso de los cristales de oxalato de calcio no es posible a través de las membranas hematoplacentarias (Schneider 1991). En trabajos para estudiar el metabolismo de los oxalatos, se ha observado que los oxalatos del rumen cuando se unen al Ca son excretados en las heces y cuando pasan a la sangre y se unen al calcio se depositan en los capilares de diámetro pequeño (10 micras), como el encéfalo y otros órganos, pero cuando pasan los espacios lesionados del riñón aparecen en la orina (Duncan 1997, Kaliskan M, 2000).

La presencia de cristales de oxalato de calcio endógenos en el riñón de humanos, es por el daño en el metabolismo de la glicina (nefrosis oxálica endógena) por un déficit de la enzima Alanin-glioxalato aminotransferasa (Ross 1988).

La nefrosis oxálica en becerros fue descrita por Rhyan en 1992, en varios casos, de la clínica de especies animales mayores de la Universidad Auburn de Indiana USA. En estos casos se recibieron 5 terneros de raza Beef Master en diferentes momentos y de diferentes edades, provenientes de diferentes ranchos, que presentaban: deshidratación, debilidad muscular y letargia. Estos becerros murieron horas después de su llegada a la clínica. En el estudio histopatológico se encontró distensión en los túbulos contorneados proximales del riñón debido a la presencia de cristales de oxalato de calcio, restos de degeneración celular, entre otros cambios. Debido a lo avanzada que se presenta la nefrosis en algunos de estos casos se puede indicar que esta condición se desarrolló durante la gestación. Las evidencias de estos casos tienden a indicar que puede presentarse un trastorno metabólico hereditario autosómico recesivo, pues como ya se mencionó los cristales de oxalato de calcio no pasan la barrera hematoplacentaria por lo cual se presenta una hyperoxaluria primaria o nefrosis oxálica endógena. Así mismo se reporta un caso con un cuadro clínico similar de un becerro que tubo los mismos signos

clínicos y hallazgos histopatológicos, que murió a los 15 minutos de haber entrado en la clínica, en este caso también se sugirió la posibilidad del defecto en el metabolismo de los oxalatos (Rhyan 1992).

De acuerdo a la información publicada se reporta mayor número de muertes por nefrosis oxálica en ovinos que en bovinos (Watts 1959).

En el trabajo realizado por Schiefer en 1974 donde se estudiaron las diferentes causas de abortos en bovinos en un periodo de 2 años, en este se encontraron que de 572 casos 175 fueron positivos a cristales de oxalatos mostrando que estas puede ser una de las causas de aborto en rumiantes de origen no infecciosa. Por esto Schiefer en 1976 realizó un estudio para reproducir el cuadro y saber si había una relación entre los abortos en ovinos y la presencia de cristales de oxalatos de calcio en los riñones de los fetos. El resultado no fue significativo, pues no se presentaron abortos en las borregas a las cuales se les suministraban oxalatos y las lesiones y cambios a la necropsia no fueron relevantes con excepción de pequeños cristales de oxalatos de Ca en los riñones de las borregas.

En otras partes del mundo como en Turkia se cuenta con informacion similar (Dulbahar 2002), a la señalada por Schiefer 1976.

I.3.5 Hiperoxaluria primaria.

La hiperoxaluria primaria (HOP) consiste en la producción excesiva de oxalato por el hígado de pacientes con anomalías genéticas de enzimas del metabolismo del glioxilato. La mayoría de las familias con HOP presentan un claro patrón «horizontal» de herencia autosómica recesiva, en la que los padres son portadores asintomáticos de mutaciones en alguno de los genes implicados. Aquellos hijos que heredan ambos alelos patológicos acaban desarrollando HPO, usualmente en edades tempranas. El tipo más frecuente de HOPI, se debe a mutaciones en el gen *AGXT* (Alanina-glioxilato aminotransferasa), localizado en el extremo del brazo largo del cromosoma 2 - 2q37-). Menos frecuente es la HOP tipo II, debida a mutaciones en el gen *GRHPR* (de glioxilato reductasa – hidroxipiruvato reductasa, localizado en el cromosoma 9). Con diferencia, *AGXT* (también conocido como *AGT*) es la enzima más importante de detoxificación del glioxalato desde el punto de vista patológico. El déficit de *AGXT* provoca un acúmulo de glioxilato que se convierte en oxalato, compuesto tóxico sin relevancia biológica en mamíferos y que sólo puede ser eliminado por los riñones (Ross 1998, Snezana 2010).

Los efectos lesivos del oxalato en el tubulo renal y la formación de cristales de oxalato cálcico monohidrato (OCM) y dihidrato (OCD) tanto en el parenquima renal (nefrocalcinosis) como en el sistema pielocalicial (urolitiasis) dan lugar a la pérdida progresiva de función renal. Cuando el riñón es insuficiente para eliminar el oxalato. Este se acumula en el organismo (oxalosis), y los depósitos de oxalato de calcio en múltiples tejidos, incluyendo huesos, vasos, corazón, retina, nervios con repercusiones graves. Aunque biológicamente se trata de un defecto hereditario del hepatocito, la célula fundamental en la detoxificación de glioxilato, y por tanto la principal productora de oxalato, las primeras manifestaciones de la enfermedad son nefrológicas (Niederwieser 1978 y Lorenzo 1990).

Por lo anterior es necesario el estudio de la nefrosis oxálica como una causa de aborto y muerte de bovinos neonatos Para una correcta identificación de esta patología es necesario identificar si la nefrosis oxálica es una manifestación de una alteración endógena del metabolismo del ácido oxálico causante de estas muertes y abortos en los becerros. O si es debida a la ingestión de altas concentraciones de ácido oxálico por la vaca o por un defecto en el metabolismo de la glicina, que daría como manifestación tanto del acumulo de oxalatos o de glioxilatos. Este daño en el metabolismo, solo ha sido notificado en humanos, por lo que es esencial la aplicación de las técnicas para aceptar o rechazar a éste como la causa de los abortos y muertes perinatales en bovinos.

Justificación.

La nefrosis oxálica se ha asociado como causa de aborto en bovinos, pero la etiología de esta nefrosis oxálica no ha sido determinada. Por lo que al no encontrarse esta metodología en animales, será un aporte al conocimiento de la fisiopatología el intento de la implementación de lo que existe en humanos.

Hipótesis.

- Los abortos y muerte perinatal de bovinos con nefro-oxalosis se asocia a títulos de anticuerpos séricos significativos de enfermedades abortivas infecciosas en las vacas.
- La nefrosis oxálica presente en los becerros con muerte perinatal se asocia al alto consumo de oxalatos por parte de la vaca.

- La nefrosis oxálica presente en los becerros con muerte perinatal se asocia a la falta de la enzima que metaboliza la glicina del peroxisoma hepático, lo que provoca un aumento en la producción de oxalato y glicolato.

Objetivos

- Determinar el título de anticuerpos séricos de las enfermedades infecciosas abortivas de la madre para descartarlas como la causa de los abortos.
- Determinar las concentraciones de ácido oxálico en forrajes (zacate insurgente: (*Brachiaria brizanta*); zacate guinea: (*Panicum maximum jacq Guinea*) y zacate estrella de Africa (*Cynodon plec tostachyus*) y hierbas como: pochinguis: *Asclepias scurassavica*; 5 negritos: *Karwinskia spp* y quelite: *Amaranthus spp* del lugar.
- Determinación de la concentración de ácido oxálico en tejido renal y hepático de los becerros de muerte perinatal.
- Identificar las lesiones macro-microscópicas: renales, hepáticas, cardíacas, oculares, digestivas, respiratorias y nerviosas asociadas a la muerte perinatal de los abortos o neonatos.
- Cuantificar los acúmulos de cristales de oxalatos de calcio con luz polarizada en los túbulos contorneados proximales de la corteza renal de lo abortos o de muerte perinatal.
- Determinar el glicolato y oxalato como bioindicadores de la deficiencia de la enzima Alanin: glioxalato-aminotransferasa en hígado de los becerros de muerte perinatal.
- Extracción de DNA de las muestras de hígado fijados en formol, deshidratadas en alcoholes y montados en parafina, de los becerros de muerte perinatal, para identificar el parentesco y el daño en el que codifica para la enzima Alanin:glioxalatoaminotransferasa

II.- Material y métodos.

II.1 Lugar de estudio.

Este estudio se realizó en el rancho “La Esperanza” que se localiza en Soto la Marina Tamaulipas y cuenta con 200 vacas en estado reproductivo. De acuerdo con la clasificación climática de Köppen modificada por Enriqueta García, el clima que predomina en el área de influencia directa de “La Esperanza” corresponde a un clima cálido subhúmedo con lluvias en verano (Aw1) y una temperatura media de 24°C. El rancho cuenta con 500 hectáreas de las cuales se dedican 250 hectáreas al pie de cría de ganado Limousin, las hectáreas restantes son reserva natural.

El rancho tiene un manejo cerrado ya que los vientres para el pie de cría se obtienen del mismo rancho y se utiliza inseminación artificial de semen de toros registrados o monta natural con toros criados en el rancho.

La alimentación de las vacas se basa en pastoreo rotacional en praderas de zacates Guinea (*Panicum maximum* Jacq. Guinea) y Estrella de África (*Cynodon plectostachyus*) con una complementación de 1 kg de alimento concentrado y sales minerales.

II.2 Selección de los animales de estudio

De las vacas gestantes del rancho se formó un grupo de 25 a partir de las vacas próximas al parto y se observaron durante un mes. De este grupo de vacas abortaron 15, a estos fetos se les realizó la necropsia para identificar las lesiones macroscópicas. Para la identificación de las lesiones microscópicas se tomaron muestras de riñón, hígado, cerebro, bazo, corazón, pulmón, intestino, ojo y parpado; de 2x2 cm de superficie y 1 cm de espesor. Se preservaron en formol al 10% en una relación de uno a diez, entre el tamaño y el volumen, hasta ser procesadas.

II.3 Estudio histopatológico

Las muestras de tejido fueron remitidas al laboratorio de la Dra. Aline Schunemann de Aluja, donde se realizaron los cortes histológicos y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina. El estudio histopatológico fue interpretado por la Dra. Aline Schunemann de Aluja y el Dr. Leopoldo H. Paasch Martínez (Celani 1984).

II.4 Estudio bajo luz polarizada y conteo de cristales de oxalato

Se examinaron bajo luz polarizada los cortes histológicos de tejidos teñidos y montados para buscar los cristales de oxalato ya que son birrefringentes. El lugar donde se localizaron los cristales birrefringentes fué en el lumen de los tubulos contorneados proximales de la nefrona. Se contaron los cristales y las nefronas en cuatro campos por laminilla de tejido renal para estimar la cantidad (Osborne 1990).

II.5 Prueba de ELISA (Ensayo por inmuno absorción ligado a enzimas).

Se tomaron muestras de sangre completa en tubos de vidrio sin anticoagulante de 15 vacas que abortaron para obtener el suero sanguíneo, con el fin de identificar el título de anticuerpos de enfermedades abortivas infecciosas bovinas por la prueba de ELISA. Las muestras de suero se congelaron hasta su procesamiento. La prueba de ELISA se realizó para determinar el título de anticuerpos de Brucelosis, Diarrea viral bovina, Campilobacteriosis, Meningo-encefalitis tromboembólica, Rinotraqueitis infecciosa bovina, Leptospirosis, Micoplasmosis bovina, Parainfluenza 3, Pasteurellosis y Virus sincital bovino. La prueba de ELISA fue realizada en el laboratorio del MVZ. José. A. Barajas Rojas y bajo sus criterios de trabajo basado en Mandell 2009.

II.6 Muestreo de pastos y hierbas

Para el análisis del contenido de ácido oxálico se tomaron muestras de los pastos Guinea (*Panicum maximum*) y Estrella de Africa (*Cynodon plectostachyus*) que se encuentran en las praderas de este rancho y que son la base de la alimentación de las vacas. También se analizó una muestra de la paca de pastos Insurgente (*Brachiaria brizantha*) que se usó como complemento alimenticio a los animales en época de secas (noviembre a febrero). Se tomaron muestras de las hierbas ponchinguis (*Asclepias scurassavica*), negrito (*Karwinskia humboltiana*) y moco de guajolote (*Amaranthus spp.*) que se encuentran en las praderas del rancho, para determinar su contenido de ácido oxálico. Se realizaron 2 muestreos de estos pastos y hierbas, uno en época de secas (enero) y el otro en época de lluvias (septiembre) para determinar la variación del contenido de ácido oxálico.

II.7 Método para la determinación de ácido oxálico

Para identificación del contenido de ácido oxálico, las muestras se secaron en un horno a 70°C durante 24 horas. Posteriormente se tomaron 500 mg y se licuaron con 100ml de agua desmineralizada, se les agregaron 10ml de ácido clorhídrico 6N, 2 gotas de alcohol isoamílico y se hirvieron por 15 minutos. Las muestras se dejaron enfriar y reposar toda la noche. Posteriormente se filtraron con papel filtro (Whatman® No1). Se tomaron 10ml del filtrado a los cuales se les agregaron 2ml de ácido tungstofosfórico, se mezclaron y se dejaron reposar 5 horas. Después se volvieron a filtrar y se tomaron 5ml y se ajustó el pH con hidróxido de amonio a 4.0-4.5. En el paso siguiente se agregaron 5ml de solución buffer de acetato con un pH de 4.5 a cada muestra y se dejaron reposar durante la noche. Las muestras se centrifugaron 15 minutos a 1700 rpm para compactar el precipitado y eliminar el sobrenadante por decantado, por medio de una inversión suave. El tubo se mantuvo boca abajo sobre papel absorbente para eliminar el excedente de sobrenadante. Se lavó el precipitado de las muestras con una solución saturada de calcio fría, asegurándose de que el sedimento se rompa y mezcle bien con la solución. Esta suspensión se centrifugó nuevamente y se decantó. El botón que se formó después del centrifugado se suspende en ácido sulfúrico y se mezcló. Posteriormente las muestras fueron leídas en un espectrómetro de absorción y emisión atómicas. El contenido de ácido oxálico se estimó de forma indirecta al leer el calcio ya que cada molécula de calcio corresponde a una de ácido oxálico. (AOAC, 1990)

Esta misma técnica fue usada para analizar el contenido de oxalatos en tejido renal y hepático de los fetos, debido a que son órganos blanco en el depósito de cristales de oxalato.

II.8 Método para la determinación de glicolato

Se tomaron muestras de tejido renal en formol al 10% para determinar las concentraciones de glicolato. Las muestras fueron secadas en un horno a 70°C durante 24 horas. Posteriormente fueron molidas en mortero con 25ml de agua desmineralizada. Se tomaron 0.5ml de las muestras y se purificaron en columnas de resina de intercambio fuertemente ácido, posteriormente las éstas fueron lavadas con 9ml de agua desmineralizada. Se ajustó el pH del eluato a 8-9 y se filtraron en columnas de resinas de intercambio fuertemente básico. Las columnas fueron lavadas con 20ml de agua desmineralizada y se desechó el eluato, posteriormente se extrajeron las muestras de la

columna con 9 ml de ácido acético 4M. Se colocaron las muestras en tubos cónicos de 50ml, se les adicionó 1ml de ácido sulfúrico 5M y se evaporaron hasta que quedó un residuo siruposos de 0.6ml. Para la reacción de color se le adicionaron a las muestra 5ml ácido chromotrópico y se pusieron en baño maría hirviendo durante 30 minutos. Se dejaron enfriar y se diluyeron con 10ml de agua desmineralizada para leer la absorbancias en un espectrofotómetro de luz visible. Para la cuantificación del glicolato las absorbancias se transformaron en concentración por medio de una regresión lineal (Neiderwieser 1978).

II.9 Método para la obtención de DNA/RNA de tejido fijado en formol al 10% y envevido en parafina (FFPE).

Se tomaron 250mg de tejido, se congelaron con nitrógeno líquido para posteriormente triturarlos. Las muestras se suspendieron en 500µl de 10 mM Tris/HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA (pH 8.0), 2% SDS (pH 7.3) adicionado con 50 µL de 60 mg/mL proteinasa K. Posteriormente se incubaron a 60°C por 16-20 hrs. Después de la incubación se trataron con Trizol. Durante el uso del método descrito por Louding y col 2007, se extrajo el RNA del tejido fijado en formol y envevido en parafina (FFPE-RNA) de la fase acuosa superior y el genómico (FFPE-DNA) de la parte orgánica inferior. El FFPE-DNA fue precipitado por la adición de 1200ul de etanol y 20 ul de acetato de sodio e incubado a temperatura de laboratorio durante 3 minutos y centrifugado a 16000 rpm durante 30 minutos y a 4 centigrados. El botón o pelet del DNA se lavó con etanol puro y se secó con aire a 50 centigrados y se resuspendió en 180 ul de buffer de ATL del kit de extracción de PPFE-DNA y se sujetó a la digestión con proteinasa K (pK) durante 48 hs a 56 centigrados (20 ul de pK (30 mg/ml al comienzo y a las 24 hs). Después de las 48 h, la solución se incubó a 90 centigrados durante una hora, se le añadieron 200 ul de buffer de AL del Kit DNA FFPE y 200 ul de etanol puro, que se mezcló en votex y transfirió a una columna MinElute. La columna se hiló a 8000 rpm durante un minuto y se lavó con 500 ul de buffers de AW1 y AW2 sucesivamente. La columna se secó por centrifugación a 14000 rpm durante 3 minutos. El DNA se eluyó con la adición 20 ul de buffer de 1xTris y centrifugación. El DNA se cuantificó en un espectrofotometro Nano-drop ND-1000 y analizadó en gel de agarosa al 1% antes de los ensayos de metilación (Ahlfen 2007, Kotorashvilli 2012).

II.10 Análisis estadístico

Para comparar la concentración de oxalato de calcio, así como la cantidad de acúmulos de cristales de oxalato de calcio en la corteza renal de dos becerros recién nacidos sanos con los becerros abortados o de muerte perinatal del estudio. Se utilizó una *t* de Student para dos medias independientes. Para considerar dos medias como diferentes significativamente se utilizó un nivel de $p < 0.05$. El análisis estadístico se realizó con el paquete Prisma 5.03 (Graph-Pad Software, Inc.)

III. Resultados.

III.1 Prueba de ELISA.

Para descartar las principales enfermedades infecciosas abortivas en las vacas de éste estudio como las causantes de los abortos presentados, se utilizó a prueba de ELISA en suero sanguíneo. En el cuadro 2 se presentan los resultados de la prueba donde se muestran en el número de animales que se dieron como positivos y el título de anticuerpos que presentaron. De acuerdo a estos datos no existen vacas positivas para estas enfermedades, ya que no pasan el punto de corte de cada enfermedad. En el caso de IBR se marcan dos individuos que presentaron anticuerpos por arriba del 80% del punto de corte, pero no son positivos a la enfermedad, debido a que las muestras de suero sanguíneo se tomaron 4 días después de la aplicación de la vacuna, por lo que es una respuesta por anticuerpos vacúnales. Los resultados dados por esta prueba son una prevalencia aparente ya que el resultado final lo dan, la diferencia del título de anticuerpos entre dos muestras a diferente tiempo. La prevalencia real solo se determina con el aislamiento del agente, pero esto sólo se hace si la prevalencia aparente es mayor al punto de corte.

Cuadro 2.

Título de anticuerpos de enfermedades infecciosas abortivas en vacas del rancho “La Esperanza”

	B	DVB	C	MT	RIB	L	MB	PI3	P	VSB
Total de positivos	0	4	3	5	4	3	5	1	6	0
% positivos	0	33	25	41	33	25	41	8	50	0
Total > 80%	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
% >80%	0	0	0	0	16	0	0	0	0	0
Punto de corte	50+	50+	60+	50+	50+	50+	60+	60+	60+	75+

Brucelosis (B), Diarrea viral bovina (DVB), Campylobacteriosis (C), Meningoencefalitis-Tromboembólica (MT), Rinotraqueitis Infecciosa bovina (RIB), Leptospirosis (L), Mycoplasmosis bovina (MB), Parainfluenza 3 (PI3), Pasteurellosis (P), Virus sincitial-bovino (VSB),

III.2 Estudio histopatológico

En el estudio histopatológico no se encontraron lesiones que pudieran relacionarse con alguna enfermedad infecciosa causante de abortos en bovinos.

En la figura 4, se muestra la presencia de cristales en la corteza renal. Estos cristales tienen forma de ataúd y fueron birrefringentes al ser vistos bajo luz polarizada por lo que fueron identificados como cristales de oxalato de calcio. Este hallazgo se asoció como parte de la fisiopatología de la causa de aborto, ya que de acuerdo a lo notificado por otros autores se ha asociado a la presencia de estos cristales como causa de nefrosis en el feto abortado y muertes de recién nacidos.

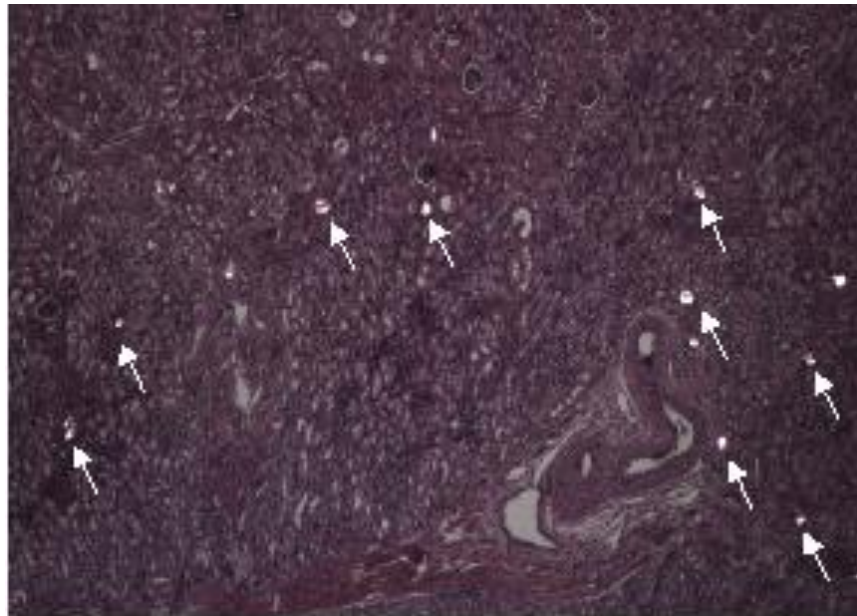


Figura 4. Corte histológico (40X) de riñón de feto abortado bajo luz polarizada y teñido con hematoxilina eosina, donde se observan cristales de oxalato de calcio en los tubulos convolutados proximales del nefrón.

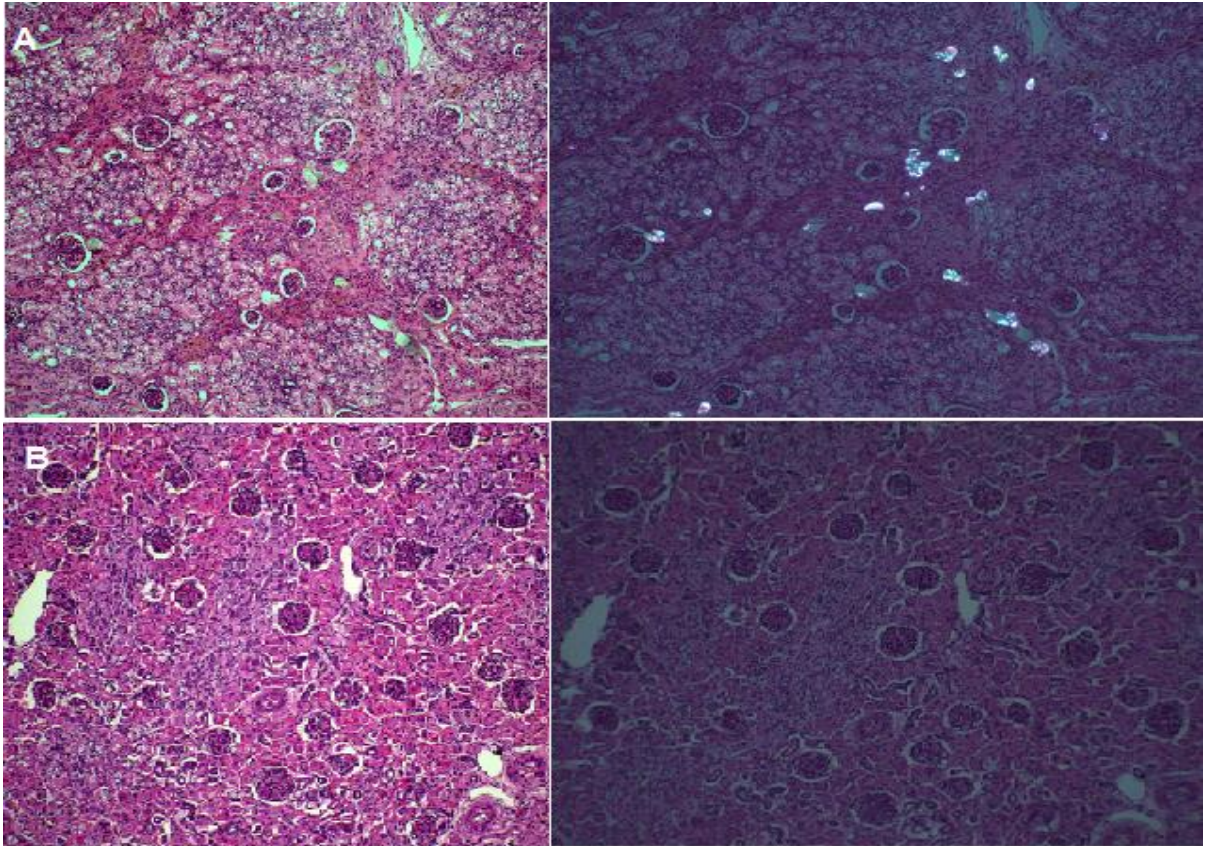


Figura 5. Corte histológico (40X) de un riñón de feto bovino abortado, en el lado izquierdo del (Panel A), sin luz polarizada y lado derecho con luz polarizada, aquí se evidencian los cristales de oxalato de calcio en los túbulos convolutados proximales del nefron. Corte histológico (Panel B), de un riñón de feto sano, lado izquierdo sin luz polarizada, lado derecho bajo luz polarizada donde se observa el tejido sano sin cristales de oxalato.

III.3 Concentraciones de ácido oxálico y número de cristales en tejido renal.

En la figura 6 se muestran las concentraciones de ácido oxálico (Panel A) y el conteo de cristales (Panel B) en tejido renal fetal.

En el panel A, se observan las diferencias entre los animales sanos (testigos) y los enfermos (caso clínico), de las concentraciones de ácido oxálico en el tejido renal, mostrando que es un elemento que está presente tanto en animales sanos como enfermos. Por otro lado existe diferencia significativa entre las concentraciones entre los animales sanos y enfermos ($P < 0.001$). La media del los becerros sanos fue de 54.56 mg/g de tejido, siendo mayor que la de los animales enfermos (37.31mg/g) de tejido.

En el panel B se observa una diferencia significativa ($P < 0.01$) en el número de cristales de oxalato de calcio, ya que en los animales enfermos, la media fue de 23.2 cristales por cuatro campos observados en corte histológico (40X) mientras que en los becerros sanos (testigo) no hubo presencia de cristales de oxalato de calcio.

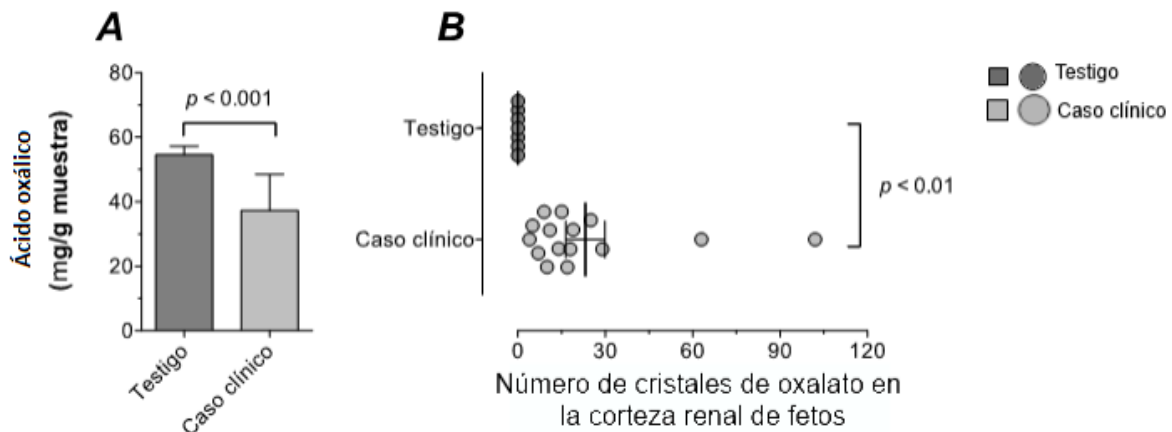


Figura 6. Concentración de ácido oxálico en tejido renal de fetos neonatos sanos y enfermos (Panel A). Así como la cantidad de cristales de oxalato de calcio en el corte histológico de tejido renal de los enfermos (caso clínico) y de los sanos (testigo) Panel B.

III.4 Concentraciones de ácido oxálico en los forrajes de la pradera como alimento de las vacas del rancho “La esperanza”.

En el cuadro 3, se observan las concentraciones de ácido oxálico en el pasto guinea (1.5%) y estrella (0.5%) en las praderas del rancho, en época de secas. Los valores en época de lluvias fueron 4.01% para el guinea y 2.74% para el estrella.

Esto muestra que las concentraciones de ácido oxálico en las plantas son menores en época de secas que en época de lluvias. Estos valores no se consideran tóxicos para los rumiantes al ser consumidos en la dieta. El pasto Insurgente que se complementaba en la época de secas a los animales del rancho tuvo en el primer muestreo: 3.5% de ácido oxálico (paca en verde) y en el segundo muestreo 1.15% (paca ceca). Los valores de ácido oxálico presentados en ésta paca tampoco se consideran tóxicos para los rumiantes. (Kingsbury 1964, Buck 1980, Zhang 2002).

Cuadro 3.

Concentraciones de ácido oxálico en los pastos de las praderas del rancho “La Esperanza” y el heno como complemento dietético.

Nombre científico	Muestreo 1	Muestreo 2
	(época de secas)	(época de lluvias)
	% oxalato	
Brachiaria brisanta (Z. insurgente) en paca	3.5	1.15
Panicum maximum (Guinea)	1.45	4.01
Cynodon plectostachius (Estrella)	0.5	2.74

En el cuadro 4, se anotan las concentraciones de ácido oxálico en las hierbas de las praderas del rancho donde se encontraba el ganado pastando. Estas son como sigue: para *Asclepias scurasavica* (Ponchinguis) de 1.01%, *Karwinskia* spp (negrito) 2.49% y *Amaranthus* spp (Quelite) 3.3%, por lo cual no se consideran toxicas, ya que no rebasan los valores toxicos para el ganado según Kingsbury 1964 y Buck 1980.

Cuadro 4.

Cantidad de ácido oxálico en malezas de las praderas del rancho “La Esperanza”.

Nombre científico	OXALATO Ca %
Asclepias (Ponchinguis)	1.01
Karwinskia (Negrito)	2.49
Amaranthus (Quelite)	3.3

III.5 Concentraciones de glicolato en tejido renal.

El glicolato se encontró tanto en los riñones de los becerros sanos como en los de los abortos y mortinatos. Se identificó una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.001$) entre los sanos y enfermos. La media de los becerros sanos fue de $358.8 \mu\text{g/g}$ de tejido, mientras que en la de los enfermos, fue menor con $191.4 \mu\text{g/g}$ tejido.

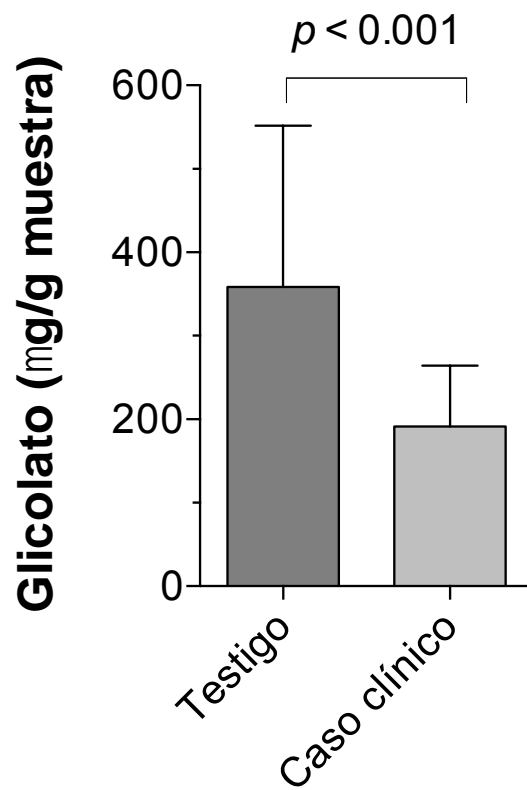


Figura 7. Concentraciones de glicolato en tejido renal de becerros sanos (testigo) y de animales enfermos (caso clínico).

IV Discusión

IV.1 Nefrosis oxálica por daño metabólico

Las concentraciones de glicolato encontradas por este método en animales enfermos o en sanos no fueron estadísticamente diferentes. Esta respuesta no se pudo comprobar al no encontrar diferencia en la lectura por la adición del estándar interno en dos muestras. Por lo que no se puede descartar el daño en el metabolismo del glioxalato como la causa de la nefrosis oxálica presente en estos fetos abortados o de muerte perinatal. Además éste resultado negativo también se asocia a que las muestras utilizadas en la prueba estaban conservadas en formol y este puede dar resultados falsos positivos, ya que crea la misma reacción de color que el glicolato (Niederwiser 1978).

En humanos, este daño en el metabolismo se denomina hiperoxaluria primaria y existen tres tipos el tipo I se debe a una mutación genética que causa una deficiencia en la enzima alanin glioxalato aminotransferasa (también conocido como AGT). Esta enzima es la más importante de la detoxificación del glioxalato desde el punto de vista de patología humana. El tipo II es un desorden que causa la deficiencia en la enzima D-glicerato deshidrogenasa, y el tipo III que se asocia con un incremento en la absorción de oxalato en el intestino (Ross 1988, Santana 2003). En bovinos, la hiperoxaluria primaria tipo I no se ha descrito.

No se puede descartar la determinación de glicolato como un indicador en el diagnóstico de la nefrosis oxálica en bovinos ya que existen algunos puntos que se deben de tomar en cuenta en estudios posteriores. Uno de ellos será el tipo de muestra, especialmente si fue sólo la corteza renal o tanto la corteza como la medula de los riñones y el uso muestras frescas es decir no fijadas en formol, solo preservadas en congelación (Neiderwiser 2009).

IV.2 Nefrosis oxálica por consumo.

Otra de las causa de la nefrosis oxálica es por el consumo de altas concentraciones de este ácido en la dieta, llamada Hiperoxaluria secundaria (Hodgkinson1987, Golbahar 2002 y García 2006), pero esta causa no puede asociarse a la nefrosis presente en estos fetos ya que en los pastos y malezas de las praderas se encontraron concentraciones por debajo del nivel tóxico. Además, en el estudio donde se suministraba ácido oxálico en la

dieta de ratas gestante se determinó que el ácido oxálico consumido por la madre no podían pasar la barrera hematoplacentaria (Sheikh-omar 1980). Otro estudio en ovejas gestantes donde se suministraron de 3, 6, 12 y 18g de ácido oxálico por animal al día, sólo se observaron algunos cristales en los riñones de las ovejas; esto sugirió que sólo a dosis de 18g podría aparecer los cristales de oxalatos en el riñón de la madre (Schiefer 1976). Ya que no existen dosis altas en en la dieta de las vacas de éste estudio que pudieran hacer sospechar que cierta cantidad de ácido oxálico consumido pasará la barrera hematoplacentaria. No se puede relacionar la presencia de los cristales del ácido oxálico consumido por las vacas gestantes en los riñones de los fetos.

IV.3 Concentración de ácido oxálico en tejido renal.

La concentración de ácido oxálico en tejido renal no es un indicador de nefrosis oxálica ya que no existe correlación entre la presencia de cristales y concentraciones de ácido oxálico. Esto debido a que el ácido oxálico que está en forma de cristal ya se encuentra unido a calcio formando oxalato de calcio. Este oxalato de calcio no se puede cuantificar por espectrometría de absorción atómica, ya que esta técnica extrae y cuantifica el ácido oxálico libre (no unido a calcio) y se base precisamente en adicionar un calcio a cada molécula de ácido oxálico y así medirlo en forma indirecta como calcio. El oxalato de calcio solo se puede medir como cristales a través de la histología, como cristales birrefringente. Por otra parte, la presencia de ácido oxálico en ambos grupos se debe a que este es un metabolito que forma parte del sistema de la generación de energía celular o sea parte del ciclo de Krebs (White 1973). Pero si existe diferencia significativa entre las concentraciones de los casos clínicos y los animales sanos, existiendo una mayor concentración en estos últimos, y esto puede estar asociado a que los fetos sanos tienen un desarrollo normal por lo que su gasto de energía es mayor.

IV.4 Presencia de cristales.

La presencia de cristales de oxalato de calcio en el tejido renal de los casos clínicos (animales enfermos) a diferencia de los testigos (animales sanos) en los que no se presentaron. Indica que este hallazgo histopatológico está relacionado con la causa de estos abortos. Se puede considerar como manifestación de la nefrosis endógena en los fetos, ya que no existe otra fuente, pues los cristales de oxalato de calcio no pasan la

barrera hemato-placentaria de la vaca. Este cambio histológico se asocia con la manifestación de la alteración de la enzima, pues no existe posibilidad de la llegada de los oxalatos al feto a través de la placenta, y la única fuente sería la formación autógena por el feto. (Schneider 1991). Es interesante y se puede presentar como evidencia, la sola determinación de los oxalatos de calcio como la causa de la insuficiencia de la enzima alanina-glioxilato aminotransferasa. Esta deficiencia de la enzima produce concentraciones anormalmente altas tanto del glicolato como de oxalato. Según lo notificado por Moffatt y Schieffer en 1974. Esta es una manifestación de las causas de aborto en rumiantes de origen no infeccioso. En el estudio de Schieffer en 1974 de 572 casos de aborto, 175 fueron positivos a la presencia de cristales de oxalato de calcio, los que se asociaron con los casos de abortos. Gulbahar, 2001 señala esta nefrosis oxálica como la causa de la muerte en un becerro recién nacido pero, la etiología de esta nefrosis no fue determinada quizá porque desconocía la función de la enzima. Pero indirectamente si se puede señalar la alta producción de oxalatos como la deficiencia de la enzima (White 1973).

IV.5 Resultados de la prueba de ELISA

De acuerdo a los resultados de la prueba de ELISA los abortos no se asocian con las enfermedades infecciosas abortivas de las vacas, de acuerdo a la metodología del laboratorio solo se da por positivo si se rebasa el punto de corte para cada enfermedad. En caso de IBR los valores de anticuerpos que se notifican están relacionados con la respuesta inmune a la vacuna que se practicó contra esta enfermedad, dos semanas antes de tomar las muestras para la prueba de ELISA (Barajas 1998). Esta prueba es recomendada para el diagnóstico primario del estado de salud del hato, pues la prueba sólo da la prevalencia aparente de la enfermedad por el título de anticuerpos. La prevalencia real sólo se da cuando se aísla el agente. Al conocer la respuesta inmune contra estos agentes infecciosos se establece si es necesario el aislamiento del agente infeccioso para el diagnóstico final.

Conclusiones

- La identificación de los cristales birrefringentes en los tubulos convolutados proximales en el corte histológico de los riñones de los abortos o de muerte perinatal, se señala como evidencia de nefrosis oxálica de origen metabólico. La cantidad de ácido oxálico en los forrajes del alimento de las vacas; contiene

cantidades inferiores a las responsables de la nefrosis alimenticia. Los cristales de oxalato de calcio en el riñón de los fetos son autógenas, pues el tamaño de la molécula de estos no pasa la barrera placentaria.

- Los resultados negativos por la prueba de ELISA en suero sanguíneo de las vacas de este estudio para enfermedades abortivas infecciosas de rumiantes, indican que los abortos no fueron causados por algún agente de este grupo de enfermedades.
- La determinación de glicolato en el riñón de los abortos o de muerte perinatal en este estudio no fue relevante para el diagnóstico de nefrosis oxálica por daño en el metabolismo de glicina ya que no existieron diferencias significativas en la concentración de glicolato en ambos grupos. De acuerdo a las condiciones experimentales de este trabajo, no se pudo identificar el daño en el metabolismo de la glicina en los fetos abortados o muerte perinatal de los becerros de esta población de Soto La Marina Tamps. por la presencia del glicolato, pero la presencia de los oxalatos si se considera como un indicador de la alteración en el metabolismo de la glicina. La falta de diferencias en la concentración del glicolato entre animales enfermos y sanos no se demostró, debido a que las muestras están fijadas en formol al 10%, el cual da un resultado falso positivo en la reacción de color de la prueba empleada.
- Es necesario realizar más estudios incluyendo la determinación de la enzima alanin glioxalato aminotransferas en hígado y/o la mutación en el gen que codifica para esta enzima. Esto con el fin de definir el mecanismo que envuelve la nefrosis oxálica en fetos o becerros de muerte perinatal bovina y su posible asociación con los abortos. Existen varios reportes que asocian este daño en el metabolismo como posible causa de aborto y muerte neonatal en bovinos y ovinos, pero no se ha realizado el diagnóstico definitivo de esta patología.
- En el ensayo para identificar el parentesco de los becerros del estudio no se logró al no poder implementar la identificación del DNA en muestras de tejidos fijadas en formol, deshidratadas por alcoholes y enveidadas en parafina.

V. Referencias

- AHLFEN von S, MISSEL A, BENDRAT K. SCLUMPBERGER M. 2007 Determinants of RNA quality from FFPE Samples. PloS One 2(12) e1261. Doi: 10. 1371 journal.pone 0001261 1. QLAGEN GmbH Germany. 2. Gemeinschaftspraxis für Pathologie. Niendorf und Hamper Hamburg, Germany
- ALLISON MJ, COOK HM y DAWSON KA. Selection of oxalate-degrading rumen bacteria in continuous cultures. J. Anim. Sci. 1981; 53: 810 – 816.
- ALLISON MJ, LITLEDIKE ET y JAMES LF. Changes in ruminal oxalate degradation rates associated with adaptation to oxalate ingestion. J Anim Sci. 1977; 5 (45): 1173 - 1179.
- ANDERSON ML., REYNOLDS JP, ROWE JD. Evidence of vertical transmission of Neospora sp. infection in dairy cattle J. Am. Vet. Med. Assoc. 1997; 210:1169-1172.
- AVILA GJ, 1995. Abortos: causas y prevención. XIX Congreso Nacional de Buiatria, Memorias Torreón, Coahuila.
- BARAJAS R JA, Aplicación de la técnica inmunoenzimática de ELISA para estudios epidemiológicos de enfermedades de ganado bovino en el trópico de México. Ciencia Veterinaria. 1998; 18:85-151.
- BUCK WB, OSWEILLER GDO, van GELDER G. 1980, Clinical and Diagnostic Veterinary Toxicology, Kendall and Hunt, Dubuque la USA.
- CALIŞKAN M. The metabolism of oxalic acid. Turk J Zool. 2000: 24;103-106 .
- CELANI MS, FERNÁNDEZ SJ, von LAWZEWITSCH I. Lecciones de Histología Veterinaria. Volumen I Microscopia y Técnicas Histológicas. I. Ed. Hemisferio sur S. A. 3ra ed. 1984.
- DUBEY JP, CARPENTER JL, SPEER CA, TOPPER MJ, UGGLA A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs J. Am. Vet. Med. Assoc. 1988, 192:1269-1285.
- DUNCAN A J , FRUTOS P, YOUNG S.A. Rates of oxalic acid degradation in the rumen of sheep and goat in response to different levels of oxalic acid administration. Aversions to oxalic acid in the food plants of sheep and goats. 1997; 65: 451 - 455.
- SIAP-SAGARPA. FINANCIERA RURAL Monografía de la carne. México D.F. 2012.

- GARCÍA OLE, BOUDA J, JARDÓN HG, MORALES SE. Diagnóstico clínico-patológico en intoxicación con etilenglicol: Informe de un caso. *Vet Méx*, 2006; 37(4): 503-512.
- DÜLBAHAR Y. Renal oxalosis in calves. *Turkia. Turk J Vet Anim Sci.* 2002; 26: 1197:1200.
- HODGKINSON A. Oxalic acid in biology and medicine. En: Libert B y Franceschi VR. Oxalate in crop plants. *J Agric Food Chem.* 1987; 35: 926 - 938.
- HOUE H. Economic impact of BVDV infection in dairies. *The International Association for Biologicals. Published by Elsevier Science Ltd.* 2003, 31:137-143.
- INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES, AGRICOLAS Y PECUARIAS. (INIFAP) 2003, Enfermedades que provocan aborto en Bovinos. Celaya, GTO. México.
- JAMES LF, BUTCHER JE. Halogeton poisoning of sheep: effect of high level oxalate intake. *J Anim Sci.* 1972; 35: 1233 - 1233.
- JAMES L, JOHNSON A. Clinical Toxicology of Oxalatoxicosis. *J Amer. Vet. Med. Assoc.* 1972; 2 (5): 231 - 243.
- KINSBURY M J. 1964, POISONOUS PLANTS of the UNITED STATES and CANADA, Prentice Hall, NJ. USA.
- KOTORASHVILLI A, RAMNAUTH A, LIU C, LIN J, YE K, KIM R, HAZAN R, ROHAN T, FINEBERG S, LOUDING O. Effective DNA/RNA 2012. Co-extraction for analysis of Micro-RNAs, and Genomic DNA from Formalin-Fixed Paraffin-Embebed specimens. *PloS ONE WWW.plosone.org* 7: issue 4, e34683,1-11
- LORENZO V, TORRES A. Diagnóstico y tratamiento de la hiperoxaluria primaria. *Nefrología* 1996;16, 2:119-127.

- MANDELL GL, BENNETT GE, DOLIN R. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7th ed. Philadelphia, Pa: Elsevier Churchill-Livingstone; 2009:chap 119.
- NIEDERWIESER A, MATASOVIĆ A, LEUMAN EP. Glycolic acid in urine. A colorimetric method with values in normal adult controls and patients with primary hyperoxaluria. Holanda. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. *Clinical Chemica Acta* 1978, 89: 13-23.
- NORTHEAST IRM. Manual e-campo.com, <http://www.e-campo.com/media/news/nl/lechtamboreprod16.htm> (2007).
- OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST 1990 VOL II . Oxalic acid in canned vegetables. Calcium oxalate precipitation method, 974.24. Association of Official Analytical Chemists Inc. USA.
- OSBORNE CA, DAVIS LS, SANNA J, UNGER LK, CLINTON CW, DEVENPORT MP. 1990. Urine crystals in domestic animals a laboratory identification guide. *Veterinary Medicine*.
- PETER AT. 2000. Abortions in Dairy Cows: New In sights and Economic Impact. *Advances in Dairy Technology*. 12:233-244.
- REDDY GS, TSERNG K, THOMAS BR, DAYAL R y NORMAN AW. Isolation and identification of 1,23-dihydroxy-24,25,26,27-tetranorvitamin D3, a new metabolite of 1,25- dihydroxyvitamin D3 produced in rat kidney. *Biochemistry*. 1987; 26: 324 - 331.
- RIVERA GH. Causas frecuentes de aborto bovino. *Rev Int Vet Perú*. 2001; 12 (2): 117-122
- RHYAN JC, SARTIN EA, ROBERT D. Several renal oxalosis in five young Beefmaster calves. *J Amer Vet Med Assoc* 1992; 201: 1907-1910.
- ROSS PH, DEAN GA. Glyoxylate Synthesis and its Modulation and Influence on Oxalate Synthesis. *The j of Urol*. 1988; 160:1617-1624.
- SANTANA A, TORRES A, SALIDO E. Patología molecular de la hiperoxaluria primaria. Islas Canarias. *Nefrología*. 2003 Vol. XXIII: 90-97.

- SCHIEFER B, MOFFATT R E. Bovine abortion associated with renal oxalosis in the fetus. *The Canad Vet J.* 1974, 15: 57-65.
- SCHIEFER B, HEWITT MP, MILLIGAN JD. Fetal renal oxalosis due to feeding oxalic acid to pregnant ewes. Berlin. *Zbl. Vet. Med. A* 1976; 23: 226-233.
- SCHNEIDER H. Placental transport function. *Reprod Fertil Dev.* 1991; 3(4): 345-353.
- SEGURA-CORREA JC, SEGURA-CORREA VM. Prevalence of abortion and stillbirth in a beef cattle system in Southeastern Mexico. *Tropical animal health and production*, 2009; 41(8): 1773-1778.
- SHEIKH-OMAR AR, SCHIFFER HB 1980. Effects of feeding oxalic acid to pregnant rats. *Pertanika.* 1980;3(1): 25-31.
- SHUPE JL, JAMES LF. 1967. Additional physiopathologic changes in *Halogeton glomeratus* (Oxalate) poisoning in sheep. Veterinary Science Department, Utah State University, Logan, Utah. 4 1-53.
- SIAP-SAGARPA. FINANCIERA RURAL. Monografía de la carne. México D.F. 2012.
- SNEZANA D, ZHANG B, BARTLAM M, SHENG YE, RAO Z, DANPURE CJ. *StrucI Biol Cryst Commun.* 2009; 66:233-236.
- TALAPATRA SK, RAY SC, SEN KC J. Calcium asimilation in ruimiants on oxalate-rich diet. *Agric Sci. Bangalore, India.* 1998; 38: 163 - 173.
- WATTS PS. Effects of oxalic acid ingestion by sheep. I. Small doses of chaff fed to sheep. *J Agric Sci.* 1959; 52: 244 - 249.
- WHITE A, HANDLER P, SMITH E, 1973 *Principles of Biochemistry.* MC Graw- Hill NY USA.
- ZHANG D, QI L, MA J, CEHG H. Morphological control of calcium oxalate dihydrate by a double-hydrophilic block copolyme. *Chem Mater.* 2002, 14:2450-2457.