



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y  
SALUD ANIMAL

“RELACIÓN ENTRE METABOLITOS SANGUÍNEOS Y CORTISOL CON  
LA CONCENTRACIÓN SANGUÍNEA DE CALCIO (TOTAL Y  
IONIZADO) EN EL POSPARTO EN VACAS LECHERAS”

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD  
ANIMAL

P R E S E N T A  
MVZ EPCV MAURICIO RENÉ MORALES OLEA

TUTOR  
DR. DAVID ALEJANDRO CONTRERAS CARO DEL CASTILLO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM

COMITÉ TUTORIAL  
DR. MIGUEL GONZÁLEZ LOZANO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM

DR. ADRIÁN GUZMÁN SÁNCHEZ  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA, UNIDAD  
XOCHIMILCO

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. MARZO DE 2021



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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**PROGRAMA:** Maestría en Ciencias de la Producción y Salud Animal

**“Relación entre metabolitos sanguíneos y cortisol con la concentración sanguínea de calcio (total y ionizado) en el posparto en vacas lecheras”**

**P R E S E N T A**

MVZ EPCV Mauricio René Morales Olea

**TUTOR**

Dr. David Alejandro Contreras Caro Del Castillo

**COMITÉ TUTORAL**

Dr. Miguel González Lozano

Dr. Adrián Guzmán Sánchez

## **Dedicatoria**

A mi madre, por ser un apoyo y un modelo de superación y de esfuerzo, por estar siempre a mi lado en todo momento.

A mis amigos, Sofía, Fernanda, Gerardo y José Ángel, quienes han sido prácticamente una segunda familia y para mí son siempre un refugio y un ejemplo.

A mis amigos y colegas patólogos clínicos del Departamento de Patología Clínica y de práctica privada, de quienes siempre recibí consejos, apoyo y dirección.

Al Dr. Jan Bouda y al EPCV Javier Coen Alfaro, quienes fueron mis mentores en Patología Clínica y serán siempre grandes ejemplos del cómo ser un profesional.

Finalmente, dedico este trabajo a todas las personas que me acompañaron en este largo y sinuoso camino, algunos que permanecen y otros que se han ido. Sin ellos y su compañía, este viaje mágico y misterioso no hubiera sido el mismo.

## **Agradecimientos**

A todos aquellos a quienes dedico este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por abrirme las puertas como alumno y como parte de su personal, y brindarme las herramientas para desempeñarme profesionalmente en aquello que me apasiona.

Al Dr. Eligio Gabriel Salgado Hernández por creer en mí y darme la oportunidad de comenzar con este proyecto.

A mi tutor el Dr. David Alejandro Contreras Caro Del Castillo por su eterna paciencia y apoyo, así como a los miembros de mi comité tutorial, el Dr. Adrián Guzmán Sánchez y el Dr. Miguel González Lozano por brindarme toda la asesoría y dedicar su tiempo a la realización de este trabajo.

A la Dra. Susana Rojas Maya del Departamento de Reproducción quien me brindó la asesoría y me dio asistencia para las mediciones de cortisol.

A la Secretaría de Posgrado e Investigación de la FMVZ/UNAM, Proyecto Jóvenes Académicos 2017, por el financiamiento para llevar a cabo este trabajo.

## Contenido

Resumen.....	8
Introducción .....	11
1. Marco Teórico.....	13
1.1. Desarrollo de la Industria Lechera en México .....	13
1.1.1. Indicadores de Producción Lechera .....	14
1.1.2. Aspectos Económicos de Sistemas de Producción de Leche .....	14
1.1.3. Retos y Perspectivas a Futuro .....	15
1.2. Periparto en Bovinos .....	17
1.2.2. Balance Energético Negativo en la Gestación.....	19
1.3. El Calostro.....	20
1.3.1. Calostrogénesis.....	20
1.4. El Periodo de Transición y Enfermedades Presentes .....	21
1.4.1. Metritis y Endometritis.....	22
1.4.2. Lipidosis Hepática.....	24
1.4.3. Retención Placentaria .....	27
1.4.4. Hipocalcemia Posparto.....	28
1.5. Calcio, Generalidades.....	28
1.5.1. Funciones del Calcio .....	29
1.5.2. Balance, regulación y movilización .....	30
1.5.3. Transporte y reabsorción renal .....	31
1.5.4. Absorción intestinal.....	32
1.5.5. Consideraciones analíticas .....	34
1.5.6. Consecuencias de hipocalcemia .....	34
1.6. Hipocalcemia Subclínica.....	35
1.7. Hipomagnesemia y Relación con Hipocalcemia.....	36
1.8 Dietas Preparto .....	36
1.9 Equilibrio Ácido/base.....	37
1.10 Relación Edad e Hipocalcemia .....	38
1.11 Calcio, Cortisol y su Impacto en Respuesta Inmune.....	38
1.12 Determinación de Lactato y Glucosa en Estrés Agudo .....	40
2. Objetivo.....	41
2.1. Objetivo(s) específico(s) .....	41

3. Hipótesis.....	41
4. Material y métodos.....	41
4.1. Descripción del área de muestreo.....	41
4.2. Selección de Animales .....	42
4.3. Toma de Muestras .....	42
4.4. Procesamiento de Muestras .....	43
4.5. Análisis de Resultados .....	43
5. Resultados .....	44
5.1. Efecto del tiempo .....	44
5.2. Calcio total y analitos ácido/base .....	48
5.3. Calcio ionizado y analitos ácido/base .....	52
Cuadro 3. Relación de calcio ionizado con analitos sanguíneos en vacas lecheras posparto.....	53
5.4. Calcio total y calcio ionizado .....	56
5.5. Cortisol y lactato .....	56
6. Discusión.....	57
7. Conclusiones .....	61
8. Referencias.....	62

## Índice de cuadros

Cuadro 1.....	44
Relación del tiempo y analitos sanguíneos en vacas lecheras postparto.	
Cuadro 2.....	48
Relación de calcio total con analitos sanguíneos en vacas lecheras posparto.	
Cuadro 3.....	53
Relación de calcio ionizado con analitos sanguíneos en vacas lecheras posparto.	

## Índice de gráficas

Gráfica 1.....	45
Comportamiento de pH sanguíneo desde el parto hasta las 96 horas posparto en vacas lecheras.	
Gráfica 2.....	46
Comportamiento de la concentración de bicarbonato sanguíneo desde parto hasta las 96 horas posparto en vacas lecheras.	
Gráfica 3.....	47
Comportamiento de la concentración de lactato sanguíneo desde parto hasta las 96 horas posparto en vacas lecheras.	
Gráfica 4.....	47
Comportamiento en la diferencia de iones fuertes sanguíneos desde parto hasta las 96 horas posparto en vacas lecheras.	
Gráfica 5.....	49
Relación de calcio total sérico y determinaciones de pH sanguíneo en vacas lecheras.	
Gráfica 6.....	50
Relación de calcio total sérico y mediciones de bicarbonato sanguíneo en vacas lecheras.	
Gráfica 7.....	51
Relación de calcio total sérico y determinaciones de lactato sanguíneo en vacas lecheras.	
Gráfica 8.....	52
Comportamiento de calcio total sérico en distintas determinaciones de diferencia de iones fuertes desde el parto hasta las 96 horas posparto en vacas lecheras.	

Gráfica 9.....	53
Comportamiento de calcio ionizado en distintas determinaciones de pH sanguíneo desde el parto hasta las 96 horas posparto en vacas lecheras.	
Gráfica 10.....	54
Comportamiento de calcio ionizado en distintas determinaciones de bicarbonato sanguíneo desde el parto hasta las 96 horas posparto en vacas lecheras.	
Gráfica 11.....	54
Comportamiento de calcio ionizado en distintas determinaciones de lactato sanguíneo desde el parto hasta las 96 horas posparto en vacas lecheras.	
Gráfica 12.....	55
Comportamiento de calcio ionizado y determinaciones de diferencia de iones fuertes desde el parto hasta las 96 horas posparto en vacas lecheras.	
Gráfica 13.....	55
Comportamiento de calcio ionizado y determinación de ácidos no volátiles desde el parto hasta las 96 horas posparto en vacas lecheras.	
Gráfica 14.....	56
Medición de calcio total sérico y calcio ionizado sanguíneo desde el parto hasta las 96 horas posparto en vacas lecheras.	
Gráfica 15.....	57
Comportamiento de cortisol sérico y determinaciones de lactato sanguíneo desde el parto hasta las 96 horas posparto en vacas lecheras.	

## Resumen

Las vacas lecheras de producciones intensivas deben ser cada vez más eficientes en cuanto al aprovechamiento de nutrientes. Al incrementar la producción láctea se debe prestar especial atención a la incidencia de enfermedades en lo que se considera el periodo de transición; una de las principales alteraciones en dicho periodo es la hipocalcemia, la cual se puede manifestar de forma clínica (paresia posparto) o subclínica, siendo la detección de ésta última de vital importancia, ya que al no presentarse semiología clínica, es prácticamente imposible su detección sin realizar determinaciones sanguíneas de calcio. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar metabolitos sanguíneos ácido/base y establecer su relación con la concentración sérica de calcio y cortisol en vacas lecheras alrededor del parto; además se compararon mediciones de calcio total y ionizado para el monitoreo de la calcemia, y se determinó la relación entre cortisol y lactato con el propósito de utilizar este último como indicador de estrés en vacas. Los resultados obtenidos en el presente estudio permiten visualizar la dinámica de analitos sanguíneos, así como la relación e impacto de las alteraciones ácido/base en la calcemia de vacas lecheras altas productoras durante el posparto, lo cual puede a su vez incrementar la eficiencia para la detección de casos de hipocalcemia subclínica, así como las enfermedades que se presentan como consecuencia de ésta última. Si bien los resultados mostraron una relación lineal directa entre la concentración de lactato y cortisol, las condiciones bajo las que se realizó este estudio también mostraron que hay alta dispersión entre analitos y por lo tanto no es conveniente extrapolar la información de uno utilizando al otro como referencia, y en consecuencia sustituir la medición de cortisol para detectar estrés en las vacas lecheras, por lo menos en las primeras horas posparto; sin embargo, quizá esta

información se puede retomar utilizando un mayor número de animales, o bien, realizar nuevas determinaciones en otras etapas productivas.

## **Abstract**

Dairy cows of intensive productions must be increasingly efficient in terms of nutrient utilization. When milk yield is increased, special attention should be given to the incidence of diseases in what is considered the transition period; One of the main alterations in this period is hypocalcemia, which can be manifested clinically (postpartum paresis) or subclinical, the latter being of vital importance since not presenting clinical semiology, its detection without performing calcium blood determinations is practically impossible. Therefore, the objective of the present work was to characterize acid / base blood metabolites and establish their relationship with the serum calcium and cortisol concentration in post calved dairy cows; In addition, measurements of total and ionized calcium were compared for the monitoring of calcemia, and the relationship between cortisol and lactate with the purpose of using the latter as an indicator of stress in cows was determined. The results obtained in the present study allows us to visualize the dynamics of blood analytes, as well as, if there is a relationship and impact of the acid / base alterations in the calcemia of high milk yield dairy cows during postpartum, which in turn can increase the efficiency for the detection of cases of subclinical hypocalcemia, as well as the diseases that occur as a result of the latter. Although the results showed a direct linear relationship between the concentration of lactate and cortisol, the conditions in this study also showed that there is high dispersion between analytes and therefore, it is not convenient to extrapolate the information from one using the other as reference, and replace the cortisol analyses to detect stress in dairy cows, at least in the first postpartum hours; however, perhaps this information can be retaken using a greater number of animals, or, to make new determinations in other productive stages.

## **Introducción**

La producción de leche en México ocupa el tercer lugar dentro de la industria alimenticia, a pesar de que, debido a la variedad de climas, regiones e incluso costumbres en nuestro país la producción es heterogénea, concentrándose principalmente en cuatro estados (Jalisco, Coahuila, Durango y Chihuahua), los cuales mantienen el 45% de la producción lechera nacional.

El crecimiento en el sector productor de leche en México ha mantenido un aumento en los últimos años, y aún se considera que existe potencial para seguir incrementando la producción a nivel nacional, que en los últimos años ha estado dentro de las diez mejores a nivel mundial. Para mantener y alcanzar el potencial de crecimiento se deben superar algunos obstáculos, como el alza de precios en insumos necesarios para la producción, falta de tecnificación en algunas regiones del país y la alta importación de leche en polvo.

Las vacas lecheras de producciones intensivas deben ser cada vez más eficientes en cuanto al aprovechamiento de nutrientes, para lo cual se han modificado dietas, instalaciones y manejos en su ciclo productivo, sin embargo al incrementar la producción se debe prestar especial atención a la incidencia de enfermedades en lo que se considera el periodo de transición (tres semanas previas y tres posteriores al parto); una de las principales alteraciones en dicho periodo es la hipocalcemia, la cual se puede manifestar de forma clínica (paresia posparto) o subclínica, siendo ésta última de vital importancia ya que al no presentarse semiología, su detección sin realizar determinaciones sanguíneas de calcio es prácticamente imposible. Otras enfermedades como metritis, endometritis, retención de placenta, lipidosis hepática, etc. también corresponden con el periodo de transición, y la hipocalcemia subclínica aumenta su incidencia

y su gravedad al estar el calcio involucrado en mecanismos de contractibilidad muscular, de función leucocitaria, entre otros; las vacas que son afectadas por enfermedades del periodo de transición disminuyen su producción y acortan su vida útil, por lo que se realiza este estudio para valorar metodologías de medición de calcio en vacas, que sean igual de precisas pero más rápidas que la remisión de muestras a un laboratorio de diagnóstico, además de establecer las posibles interacciones entre determinaciones de equilibrio ácido/base y calcio en sangre. Por último, se mide lactato y se plantea su utilización como analito indicador de estrés al correlacionarlo con mediciones sanguíneas de cortisol.

## **1. Marco Teórico**

### **1.1. Desarrollo de la Industria Lechera en México**

La producción de leche en México en los últimos cinco años ha crecido en un 2.1% de forma anual, pasando de 11,037 millones de litros en 2012 a 11,769 millones de litros en 2016 (SAGARPA, 2017). El país ocupa el noveno lugar en producción de leche a nivel mundial, después de la Unión Europea (UE), Estados Unidos (EUA), India, China, Rusia, Brasil, Nueva Zelanda y Argentina. También es el quinto mayor importador de este producto (Secretaría de Economía, 2012).

Los sistemas para producción de leche en México son muy heterogéneos, como consecuencia de la gran variedad de climas y regiones de nuestro territorio, e incluso considerando las costumbres de las distintas poblaciones en el país. Sin embargo, la industria de productos lácteos es la tercera actividad más importante dentro de la rama de la industria de alimentos en México (Secretaría de Economía, 2012). Según cifras del Servicio de Información Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) de la SADER, durante el periodo 2003-2011 la producción nacional de leche de bovino ha tenido una tasa media de crecimiento de 1.3% (SADER, 2017).

La producción lechera en México se desarrolla en todo su territorio, pero durante el periodo de 2005 a 2010 se concentró principalmente en cuatro estados que contribuyeron conjuntamente con el 45% de la producción nacional de leche en este periodo (en primer lugar Jalisco, y siguiéndole Coahuila, Durango y Chihuahua). Cabe señalar, que los estados de Coahuila y Durango se encuentran ubicados en la Región de “La Laguna”, que es la cuenca lechera más importante del país (Secretaría de Economía, 2012).

### **1.1.1. Indicadores de Producción Lechera**

En la revisión del comportamiento de la producción láctea nacional, en poco más de tres décadas que comprende desde la última etapa de control de precios y hasta la de aplicación y vigencia de la desregulación y apertura gradual del mercado de leche y lácteos (aunque no es el único factor al que es atribuible, dada la participación de otras dependencias relacionadas dentro del sector como SADER y LICONSA), se observa una tendencia de crecimiento que se sostiene desde inicios de la década de los noventa hasta la actualidad (Secretaría de Economía, 2012)

México mantiene una tasa anual de crecimiento promedio de 1.3 % (Loera y Banda, 2017) en producción de leche. Entre 2003 y 2010 la zona árida y semiárida del país registró un crecimiento anual promedio de 1.9% en tanto la zona templada la producción se incrementó a una tasa promedio de 1.0 % anual. En la zona tropical el mismo indicador de producción fue de sólo 0.8%, y aquí se tiene un contraste importante, ya que, si bien la disponibilidad de agua es mayor y por ende las condiciones para la producción láctea en un sistema intensivo son más idóneas que en otras regiones del país, la producción en el trópico se orienta al doble propósito en sistemas de traspatio y familiares (Secretaría de Economía, 2012).

### **1.1.2. Aspectos Económicos de Sistemas de Producción de Leche**

La producción de leche presenta una diversidad de condiciones que van determinando los costos de producción. Entre los principales factores que influyen en este tema se tienen: el grado de tecnificación, tipo de alimentación del ganado, raza (o si se tiene ganado lechero especializado), así como condiciones climáticas y de disponibilidad de agua (Secretaría de Economía, 2012).

Al considerar el grado de tecnificación en cuanto a producción de leche, los costos son altos a medida que los sistemas de producción sean más tecnificados, lo cual está relacionado a costos de alimentación, gastos generales, depreciaciones, pagos de impuestos y gastos financieros, entre otros. En contraste, los sistemas de menor tecnificación tienen un mayor peso en cuanto a costos correspondientes con mano de obra, y no tienen costos por servicios financieros (Secretaría de Economía, 2012).

Al comparar costos de producción dentro de las principales actividades pecuarias, se observa que en el caso de la producción de leche éstos son los más bajos, ya que aunque el costo de la alimentación tiene un peso del 65% en el costo total de producción, la participación de los granos forrajeros en el costo total es el menor dentro del conjunto de estas actividades (Secretaría de Economía, 2012).

Estados como Coahuila, Durango y Chihuahua ocupan las primeras posiciones en la producción láctea nacional, a pesar de que no cuentan con condiciones climáticas idóneas ni tienen abundancia en cuanto a disponibilidad de agua. Sin embargo, aunque la producción de leche se lleva a cabo sin un mayor impacto en cuanto a costos, competitividad y productividad, fenómenos prolongados de sequía o aquellos que afecten la disponibilidad de agua en el norte del país impactarán en la producción de granos y forraje lo cual condicionará el funcionamiento y abasto de los establos, provocando gran afectación en esta actividad ganadera (Secretaría de Economía, 2012).

### **1.1.3. Retos y Perspectivas a Futuro**

El consumo nacional de leche *per capita* ronda los 130 litros/año, sin embargo, la recomendación de la FAO es una ingesta de 180 litros en ese mismo periodo de tiempo. A pesar del crecimiento que la industria ha tenido en los últimos años, y del potencial que tiene

para hacerlo aún más, se deben considerar ciertas limitaciones, como la creciente importación de leche en polvo misma que provoca que ese potencial de crecimiento no se logre al desplazar la producción nacional. En los últimos cuatro años el ingreso de leche en polvo se ha incrementado hasta 55 %, en años anteriores se importaban alrededor de 220 mil toneladas de leche en polvo y en 2017 aumentó hasta 340 mil. Aproximadamente el 95 % de las importaciones provienen de EUA, en contraste el ingreso de este mismo producto a territorio estadounidense no lo permite la ley de ese país (Moreno, 2017).

México posee el segundo lugar en el mundo como comprador de leche en polvo, con el 7.9 % de las importaciones globales, por el contrario, apenas exporta un millón de litros a destinos como América Central, EUA, Venezuela, República Dominicana y Perú (Secretaría de Economía, 2012).

Otra limitante que enfrentan los productores lecheros en México es el hecho de que la adquisición de la mayoría de los insumos están ligados al precio del dólar. Al devaluarse el peso mexicano se generan pérdidas económicas importantes para los establos lecheros (Moreno, 2017).

En su mayoría es debido a estos factores que deben implementarse herramientas dentro del área de la medicina y zootecnia de bovinos lecheros para incrementar la eficiencia en las producciones, atendiendo problemáticas como la incidencia de enfermedades que impactan de manera negativa en la vida productiva de estos animales. Comprender los puntos críticos en la cadena de producción es de vital importancia para poder establecer indicadores diagnósticos que aumenten la sensibilidad en la detección de procesos patológicos que afecten a las vacas.

## **1.2. Periparto en Bovinos**

### **1.2.1 Participación Endocrina en Gestación y Lactancia**

El periodo de gestación comprende el tiempo que transcurre entre la fertilización del ovocito y el parto. Al estar gestante la vaca, el cuerpo lúteo no es lizado como pasaría de forma normal durante el ciclo estral. La persistencia del cuerpo lúteo, así como la producción de progesterona por éste son esenciales para el mantenimiento de la gestación en la vaca. En la fase temprana de la gestación la progesterona estimula el desarrollo glandular del endometrio y causa quiescencia uterina. A medida que la gestación avanza se incrementan las concentraciones de progesterona en sangre periférica lo cual indica alguna fuente de producción de la hormona además del ovario; la progesterona producida posterior a los 200 días de gestación proviene principalmente de la placenta (Kobayashi et al., 1999).

Los estrógenos estimulan el crecimiento celular uterino y la actividad metabólica, e incluso administrados en dosis elevadas pueden causar abortos. La eliminación vía renal de estrógenos aumenta durante la gestación, sin embargo, alrededor de 40 h previas al parto se incrementa la concentración en sangre. La somatotropina u hormona del crecimiento (GH), promueve la utilización de glucosa por parte del tejido de la ubre, bloqueando su disponibilidad para otros tejidos, desacoplando el eje somatotrópico, y provocando así una desensibilización hepática a la GH, que se traduce en menores concentraciones de IGF-1; éste es un mecanismo utilizado en mayor medida por la vaca lechera de alta producción. Esto repercute en varios órganos y tejidos, pero se destaca que la falta de retroalimentación negativa sobre la GH tiene como consecuencia una mayor concentración circulante de la misma. Asimismo, menores concentraciones de IGF-I favorecen el catabolismo periférico que soporta la lactancia (Kobayashi et al., 1999).

La insulina tiene una función muy importante en la sensibilidad hepática a la GH (Kobayashi et al., 1999); se encontraron concentraciones de insulina disminuidas alrededor del parto, correspondiente con la reducción de la ingesta que caracteriza el periodo de transición (Bertics et al., 1992). Algunos estudios mostraron que la concentración de insulina se recuperó totalmente al día 30 posparto (Meikle et al., 2005), mientras que en otros donde se midió hasta el día 60 posparto, esto no sucedió (Pereira et al., 2010). Existe evidencia de que las vacas de mayor potencial genético para producción de leche tienen mayores concentraciones de GH y menores de insulina e IGF1 en sangre. Las concentraciones de IGF-1 en el periparto y lactación temprana fueron mayores en las vacas multíparas de condición corporal más alta (Gong et al., 2002).

El equilibrio entre concentraciones de progesterona altas y la elevada eliminación de estrógenos, así como la producción y acción de otras hormonas durante la gestación son mecanismos que permiten asegurar un flujo de energía y nutrientes de manera uniforme hacia la glándula mamaria, y apoyar la lactación (Bauman y Currie, 1980).

Otras hormonas participan contribuyendo al ambiente endocrino que favorece la lactancia. Vacas con BEN tienen concentraciones de hormonas tiroideas más bajas, lo que facilita que los tejidos periféricos adapten su metabolismo energético local a esta nueva condición catabólica (Capuco et al., 2001; Meikle et al., 2004); las concentraciones de leptina varían con cambios en el porcentaje de depósitos grasos y/o estado de reserva corporal (Delavaud y col., 2002; Meikle et al., 2004). Las vacas lecheras frecuentemente pierden más del 60 % de su grasa corporal en lactación temprana (Tamming et al., 1997; Chilliard, 1999); la concentración de leptina es un buen indicador de grasa corporal en vacas lecheras en el periparto (Meikle et al., 2004, 2006; Cavestany et al., 2005, 2009).

### **1.2.2. Balance Energético Negativo en la Gestación**

Al inicio de la lactancia, la energía requerida para mantener la producción de leche supera la de la ingesta y la vaca debe movilizar nutrientes de las reservas corporales. Esto es visible por la pérdida de condición corporal (Chilliard, 1999).

La severidad del BEN para cada vaca dependerá de su potencial genético de producción, de sus reservas energéticas corporales, y además de su capacidad de ingesta de materia seca (MS), éste último es el factor más importante para determinar la magnitud del BEN (Invgartsen y Andersen, 2000). En sistemas intensivos de producción de leche de bovinos, las vacas no logran ingerir suficiente MS que les permita mantener una alta producción, para la que genéticamente tienen el potencial (Kolver y Muller 1998; Chilibroste et al., 2010). Además suman a sus requerimientos el gasto de energía extra para cubrir las caminatas diarias desde el corral a la sala de ordeño. Las variaciones en ingesta, metabolismo y excreción durante este periodo pueden ser monitoreados por la concentración de algunos metabolitos en sangre como los ácidos grasos no esterificados (NEFA's) o  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB). Al momento no hay un sólo metabolito que al medirse refleje directamente los cambios en el metabolismo o requerimientos nutricionales, por lo tanto, se debe utilizar una combinación de los mismos (Bergman, 1990; Whitaker et al., 1999).

La gran movilización grasa que ocurre en pre y posparto temprano se acompaña de una pronunciada elevación de ácidos grasos no esterificados (NEFA's). Este incremento de NEFA's puede ser seguido de una producción aumentada de  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB) el cual refleja la lipólisis y déficit energético. No sólo los niveles de NEFA's y BHB aumentan en el periparto en vacas lecheras en pastoreo, sino que vacas con mayor condición corporal (CC) movilizan más NEFA's que vacas con pobre CC en el preparto o al parto. Los valores de albúmina y urea

son buenos indicadores del nivel proteico de la alimentación. Vacas con dietas pobres en proteína compensan en parte el déficit a través de la movilización de sus reservas corporales y la disminución de la eliminación renal de urea, lo que se refleja en pérdida de peso, CC y disminución de la producción láctea (Whitaker et al., 1999). Por otro lado, el consumo diario de proteína está correlacionado positivamente con el consumo de MS que gradualmente se incrementa durante el posparto. Los compuestos nitrogenados disminuyen alrededor del parto y están vinculados a la dieta de los animales (Cavestany et al., 2005, 2009; Pereira et al., 2010).

### **1.3. El Calostro**

El calostro es la primera secreción que produce la glándula mamaria previo al parto, las concentraciones de inmunoglobulinas que contiene sobrepasan de 5 a 10 veces las presentes en plasma (Elfstrand, et al., 2002); el paso de inmunoglobulinas de la madre hacia el calostro inicia varias semanas previas al parto y es detenido abruptamente muy cercano a éste (Weaver et al., 2000).

Debido a que la placenta de la vaca no permite que la sangre de la madre y el becerro se combinen, no hay transmisión de anticuerpos (Ig's) hacia la cría *in utero*. Por lo tanto, al momento del nacimiento el becerro presenta una agammaglobulinemia que a su vez es resuelta con la ingestión de calostro. Dentro de las primeras 8 h posteriores al nacimiento la cría adquiere lo que se conoce como inmunidad pasiva mediante la absorción intestinal de Ig's, y que le confiere protección contra enfermedades hasta que su propio sistema inmune se considere funcional (Godden, 2008).

#### **1.3.1. Calostrogénesis**

La señalización para iniciar la producción de calostro tiene que ver en gran medida con la concentración de varias hormonas tales como estrógenos, corticosteroides, hormona del

crecimiento (GH), prolactina (PRL) y progesterona (Pritchett et al., 1991) Al acercarse el parto (2 a 3 semanas antes) se incrementan las concentraciones de estrógenos, PRL, GH y cortisol (Convey, 1974), mientras que la concentración de progesterona comienza a disminuir drásticamente hasta concentraciones  $< 1.5$  ng/mL las últimas 36 h previas al parto (Tucker, 1981). Los cambios en las concentraciones de progesterona y estrógenos inician la actividad de los receptores para internalizar IgG<sub>1</sub> (Tucker, 1985), misma que se detiene una vez que termina la calostrogénesis y comienza la producción de leche (lactogénesis). Otro factor que puede modificar las concentraciones de IgG<sub>1</sub> es la implementación de sistemas de ordeño preparto (10 días) en donde se observa un aumento en la concentración de IgG<sub>1</sub> en comparación a vacas con ordeñas posparto (Winger et al., 1995).

Además de la transferencia de inmunidad, que se considera la función más importante, el calostro también cumple con el papel de nutrir a la cría en sus primeras horas de vida. Los principales nutrientes que contiene son proteínas, como caseína e inmunoglobulinas, y grasa (Davis y Drackley, 1998), los cuales se encuentran en porcentajes mayores que en leche, siendo en proteínas una diferencia de 23.9% en calostro y 12.9% en la leche, mientras que de grasa hay una diferencia en porcentaje de 6.7 y 3.6 respectivamente. Algunos otros nutrientes son vitaminas B12, A, E, carotenos, riboflavina, ácido fólico, etc.; y minerales: Ca, Mg, Zn, Mn, Fe, Co también se encuentran en el calostro (Godden, 2008).

#### **1.4. El Periodo de Transición y Enfermedades Presentes**

Durante tres semanas previas al parto y tres semanas posteriores al mismo la vaca es sometida a un desajuste metabólico drástico. En este periodo debe adaptar su metabolismo a las altas exigencias que le demanda la movilización de nutrientes requeridos para la síntesis de calostro y leche, además del cambio de régimen alimenticio acorde con su nuevo nivel de

requerimientos nutricionales (Drackley, 1999). Durante las últimas semanas de la gestación el consumo de alimento disminuye aproximadamente en un 30% (Grummer, 1995) lo cual facilita la presentación del BEN.

Uno de los principales objetivos en los sistemas de producción lechera es lograr la gestación de las vacas lo antes posible después de cada parto, lo que a su vez producirá más lactancias y más becerros durante la vida productiva de cada vaca. Factores técnicos como fallas en la detección de celos, o bien, la incidencia de patologías posparto (y las consecuencias de éstas) provocan ineficiencia reproductiva, impactando de forma negativa el futuro fértil de las hembras (Rutter, 2015).

#### **1.4.1. Metritis y Endometritis**

La presentación de infecciones en el útero (metritis, endometritis) depende en parte de aspectos endócrinos que involucran en particular a la progesterona ( $P_4$ ), la cual actúa como inmunosupresora a nivel uterino. Al formarse el primer cuerpo lúteo (CL) después del parto, el aumento de progesterona ( $P_4$ ) precede al surgimiento de las enfermedades uterinas. La presencia de bacterias en lumen uterino puede no producir infección siempre que la  $P_4$  se mantenga en concentraciones bajas y tarde más tiempo en incrementar (Del Vecchio et al., 1994)

La acción inmunosupresora tanto de la  $P_4$  como de los glucocorticoides contribuye a un aumento de la contaminación uterina y la sucesiva infección. La  $P_4$  es inmunosupresora y responsable en los mecanismos de síntesis de  $PGF2\alpha$  y una gran variedad de citocinas inmunomoduladoras. La acción de la  $PGF2\alpha$  estimula la luteólisis reduciendo la  $P_4$  y aumentando la concentración de estrógenos ( $E_2$ ) lo que aumenta las defensas uterinas. El útero es muy resistente a infecciones durante la fase estrogénica de su ciclo (aproximadamente entre

los días 18 y 5) pero la susceptibilidad aumenta considerablemente durante la fase progestacional, entre los días 6 y 17 aproximadamente (Arck et al., 2007). En esta última fase el útero es más susceptible debido a varias razones: 1) el pH cervical, que es alcalino en cualquier fase del ciclo estral, se vuelve menos alcalino (pH 7.2-7.4) que en la fase progestacional (alrededor de 7.6) creándose condiciones favorables para el desarrollo de bacterias (Tsiligianni et al., 2001), 2) el epitelio uterino es menos permeable a las bacterias, lo cual ocasiona que el sistema inmunológico sea estimulado tardíamente, 3) hay una aparición retardada de leucocitos a niveles endometrial y en el lumen uterino y 4) Las secreciones uterinas son escasas y no tienen acción de opsonización (Lewis, 2003).

Dentro del posparto debe diferenciarse una fase inicial comprendida entre el parto y el momento en que comienza la sensibilización de la hipófisis a la GnRH. En este periodo que dura entre 8 y 14 días, el ovario produce cantidades mínimas de  $E_2$  y  $P_4$ . Se puede producir una endometritis aguda posparto, precedida o no de retención de placenta; a partir del momento en que la hipófisis se hace sensible a la GnRH y hasta la primera ovulación (periodo de duración variable), existen niveles elevados de  $PGF2\alpha$  a nivel uterino necesarios para completar la involución uterina. En hembras sanas y con adecuada nutrición la primera ovulación tiene lugar cuando la  $PGF2\alpha$  llega a niveles basales. Durante esta fase, en un puerperio normal, la población bacteriana uterina que se había incrementado por el parto, se reduce notablemente y la ciclicidad ovárica se reinicia junto con un proceso de “auto limpieza” uterina. En vacas en las que existen factores predisponentes como condición corporal baja (inferior a 2.5), higiene deficiente durante el parto, presentación de patologías metabólicas (cetosis, hipocalcemia), distocias, retención de membranas fetales, etc., se observa una persistencia de agentes microbianos después de la primera ovulación con la consiguiente infección uterina. En este

último caso, los niveles de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  permanecen elevados durante un periodo mayor inhibiendo y por lo tanto postergando más, el reinicio de la ciclicidad produciendo además una sub-involución uterina (Sheldon et al., 2006).

#### **1.4.2. Lipidosis Hepática**

Otra de las enfermedades frecuentes durante el posparto es la lipidosis hepática, la cual comienza a desarrollarse poco antes del parto, pero se agudiza al inicio de la lactancia (Cadórniga-Valiño, 1997). Con frecuencia se ha observado en vacas gordas, pero también en aquellas de condición corporal media, por ello la condición corporal al parto es considerada sólo un factor predisponente. Existe una correlación positiva entre la pérdida de peso corporal en el postparto y la presentación del síndrome, lo cual explicaría la presentación en vacas gordas y también en vacas con un estado nutricional medio que sufren un déficit de energía (Bobe et al., 2004).

La movilización de lípidos se inicia algunas semanas previas al parto, sin embargo, la presentación clínica más severa se observa con frecuencia en la segunda semana de lactancia, que es donde la infiltración de grasa en el hígado puede ser superior a 20% (Gruffat et al., 1997). Normalmente se considera como fisiológico un porcentaje de infiltración lipídica de 12-13%, que paulatinamente comienza a disminuir a medida que progresa la lactancia (Herdt, 2000).

La causa más frecuente de deficiencias en consumo y disponibilidad de energía se asocia a una ingesta insuficiente de alimentos, ya sea por falta en aporte o consumo voluntario limitado. Esta situación se puede presentar al emplear forrajes con escasa cantidad de materia seca, que producen llenado ruminal, sin cubrir los requerimientos, trastornos digestivos que alteren la

absorción, disminución del apetito o alimentos de mala calidad, con escasa digestibilidad o mal balanceados (Contreras, 1997). El estrés del parto, los desbalances hormonales y una combinación de estos factores también pueden provocar el déficit de energía (Chilliard, 1993; Grummer, 1993).

Al entrar en BEN el nutriente más limitado es la glucosa, ya que en la vaca debe ser sintetizada mediante gluconeogénesis hepática a partir de sus precursores tales como propionato y NEFA's, que pueden contribuir en la formación de glucosa en 30-50% (Sutton et al., 2003; Bell, 1995), lactato, en aproximadamente un 10% (Huntington, 1990), aminoácidos, en aproximadamente un 9% (Bell y Bauman, 1997) y glicerol en un 5%, pero que puede llegar hasta un 23% en casos de ayuno prolongado (Bergman, 1990). La etapa de mayor requerimiento de glucosa es la lactancia, así, una vaca de 20 litros de producción requiere 1,440 g/diarios de glucosa, que deben ser sintetizados por el hígado (Orellana, 1994).

En este periodo de inicio de lactancia y en estado de BEN los animales presentan hipoglucemia e hipoinsulinemia; además de una elevación en concentración de hormonas lipolíticas, como la hormona del crecimiento (GH), el lactógeno placentario (LP) y la prolactina (PRL). Esta condición establece un balance metabólico-hormonal, que favorece la movilización de grasas desde las reservas corporales (Rukkwamsuk et al., 1999). Las hormonas lipolíticas determinan que la capacidad de movilización de grasas de los tejidos de depósito sea óptima. Estas hormonas actúan en el tejido adiposo y activan a la lipasa sensible a hormonas mediante fosforilación mediada por AMPc, actuando sobre triglicéridos y transformándolos en diglicéridos; posteriormente las hidrolasas específicas de diglicéridos y monoglicéridos liberan ácidos grasos y glicerol. Los ácidos grasos son separados del glicerol y transportados en circulación unidos a proteínas específicas. La liberación de adrenalina y noradrenalina también

estimula la formación de AMPc en tejido adiposo y muscular, por lo que en situaciones de miedo y/o excitación en los animales se producen pérdida de peso y aumento de la concentración de ácidos grasos en la sangre (Hancock, 2008).

Principalmente en el hígado, aunque también en músculos y riñones, por medio de la  $\beta$ -oxidación los ácidos grasos se convierten en moléculas de acetil CoA las cuales son incorporadas al ciclo de Krebs para la producción de energía (ATP). El glicerol dará origen a glucosa en el hígado. Cuando la cantidad de grasa movilizada supera la capacidad de oxidación por el hígado, el excedente de moléculas de acetil CoA no ingresa al ciclo de Krebs, dando origen a cuerpos cetónicos. El exceso de ácidos grasos y de glicerol que ingresa al hepatocito no se oxida, se reesterifica, dando origen a triglicéridos, ahora, dentro de la célula hepática (Grummer, 1993).

En situaciones normales la reesterificación ocurre en el hepatocito, pero en cantidad moderada, lo que se considera como reserva para ser usada como fuente de energía. La gran mayoría de estos triglicéridos debe salir del hepatocito para ser utilizados como fuente de energía en otros tejidos y para la síntesis de grasa en la leche (Herdt, 2000). Para que esto ocurra, el hígado debe ser capaz de sintetizar una apolipoproteína B (apo B), derivada de una lipoproteína de muy baja densidad (VLDL). Esta lipoproteína es la que se une a los triglicéridos y permite su transporte desde el hepatocito hacia otros tejidos. Si la cantidad de triglicéridos que se está reesterificando en el hígado excede la capacidad de éste para sintetizar los componentes de la VLDL, los triglicéridos se depositan en los hepatocitos en forma de gotas de grasa (Herdt, 2000; Bobe et al., 2004). Al inicio de la lactancia el hígado disminuye su capacidad de sintetizar la apolipoproteína B (apo B), por lo que la infiltración grasa del hígado, al inicio de la lactancia, está asociada a una severa disminución intrahepática de apoB (Gruffat et al., 1997).

La infiltración de triglicéridos altera las funciones del hígado disminuyendo su capacidad de gluconeogénesis (Cadórniga-Valiño et al., 1997) y limitando la eficiencia de los mecanismos compensatorios de la vaca para enfrentar el déficit de energía al inicio de la lactancia. Las lesiones observadas en el hígado de vacas con lipidosis hepática son: aumento de volumen del hepatocito, compresión de sinusoides, disminución del retículo endoplásmico y daño en las mitocondrias. Este proceso de infiltración de grasas también afecta al hígado, músculos, riñones, adrenales y otros tejidos, causando manifestaciones clínicas propias de disfunción en cada órgano donde se infiltra (Bobe et al., 2004).

### **1.4.3. Retención Placentaria**

Es una alteración reproductiva causante de importantes pérdidas económicas en producción de leche. Se puede considerar RP cuando la placenta no ha sido expulsada antes de las 12 h posteriores al parto. En condiciones normales la expulsión de la placenta es favorecida por la isquemia en los placentomas, ya que durante el parto y luego del mismo, se produce vasoconstricción en el útero lo que lleva a una necrosis gradual de la unión carúncula materna-cotiledón fetal, y desprendimiento paulatino de las distintas capas de dicha unión. Además, dado que el cotiledón actúa como cuerpo extraño luego del parto, éste libera sustancias quimiotácticas para favorecer la infiltración de los placentomas por neutrófilos periféricos, quienes digerirían la unión carúncula materna-cotiledón fetal (Silva et al., 2002).

Factores que afectan la capacidad migratoria de los neutrófilos, provocarían en consecuencia un menor número de éstos en los placentomas, y por lo tanto una menor cantidad de enzimas proteolíticas disponibles para la digestión de la unión materno-fetal. Se ha correlacionado la disminución en la actividad de los neutrófilos sanguíneos durante el periparto con el retardo en el desprendimiento de la placenta en la vaca (Kimura et al., 2002; Silva et al., 2002), así como

también una asociación entre la mayor actividad quimiotáctica de los placentomas y significativamente mayor infiltración leucocitaria de vacas con una expulsión normal de placenta que los de vacas con retención placentaria (Beagley et al., 2010; Silva et al., 2002).

#### **1.4.4. Hipocalcemia Posparto**

La hipocalcemia posparto también puede afectar seriamente el metabolismo de los leucocitos (Detilleux et al., 1995). La primera señal que se puede detectar durante la activación de los leucocitos, es el incremento de la concentración intracelular del calcio ionizado  $[Ca^{2+}]_i$  (Dubois y Rouzair-Dubois, 1993). Este incremento es necesario para poner en marcha los distintos sistemas enzimáticos (para la síntesis y liberación de interleucinas y otros mediadores leucocitarios (Silva, 2002). La capacidad de migración de los neutrófilos y su poder fagocítico, también dependen fundamentalmente de los niveles del  $[Ca^{2+}]_i$ , pues las proteínas que regulan la diapédesis son dependientes de este mineral. Los pseudópodos pueden contraerse debido a que la miosina puede dirigir los filamentos de actina hacia áreas del citoplasma que tienen una alta concentración de calcio. Los procesos de diapédesis y fagocitosis dependen en parte, de la cascada enzimática del ácido araquidónico con la producción de leucotrienos, específicamente del leucotrieno B<sub>4</sub>. En este proceso, el calcio es fundamental y determinante para la activación de fosfolipasa A<sub>2</sub>, que es la primera enzima de la reacción (Silva, 2002).

#### **1.5. Calcio, Generalidades**

El calcio es un mineral fundamental en la homeostasis de los vertebrados; entre sus funciones importantes destacan contractibilidad muscular, actividad enzimática, secreción hormonal y adhesión celular, así como ser componente estructural de huesos y dientes (Rosol et al., 1995). La regulación de forma precisa de la calcemia en líquido extracelular es vital para mantener una concentración constante de calcio a pesar de variaciones en consumo y excreción. Para

lograr esto, los organismos se valen de diversos mecanismos endocrinos basados principalmente en tres hormonas: paratohormona (PTH), calcitonina (CT) y vitamina D; sin embargo algunas otras como los corticosteroides, estrógenos, T<sub>4</sub>, glucagon y prPTH también pueden regular las concentraciones de calcio en situaciones específicas (Capen y Rosol, 1989).

Los animales neonatos o en crecimiento mantienen concentraciones de calcio extracelular ligeramente más altas que aquellos en edad adulta (Hazewinkel, 1991; Szenci et al. 1994). La mayoría del calcio en vertebrados (99%) se encuentra en los huesos formando una matriz inorgánica conocida como hidroxapatita. Del calcio restante 0.9% permanece en membranas celulares y retículo endoplásmico, y sólo el 0.1% se encuentra en el líquido extracelular. Del calcio extracelular aproximadamente el 50% se encuentra en forma ionizada (Ca<sup>2+</sup>), la cual es la forma biológicamente activa. El resto del calcio está unido a aniones como citrato, bicarbonato, fosfatos o lactato, y a proteínas; ésta última representa el 45% del calcio total y va unido a sitios de carga negativa principalmente en albúmina, y en mínima parte a globulinas. La fracción que va unida a proteínas también sufre cambios debido al pH sanguíneo, ya que mientras éste se va tornando ácido, la concentración de calcio ionizado incrementa debido a que se presenta “competencia” por los sitios de unión en proteínas con los hidrogeniones que se están generando en un estado de acidosis (Chew *et al.*, 1992).

### **1.5.1. Funciones del Calcio**

El calcio tiene dos principales funciones en un organismo: mantener integridad estructural de huesos y dientes, y participar como mensajero o ion regulador (Ebashi, 1985). El gradiente de concentración con una diferencia entre líquido extracelular (1.2 mmol/L) y el citoplasma (100.0 nmol) le permiten funcionar como ion de señalización, y a su vez, activar una serie de procesos dentro de las células. La membrana celular tiene una baja permeabilidad al calcio, por lo tanto,

éste se vale de otros mecanismos para llegar al citoplasma, como el uso de “canales” regulados por potencial de membrana, presencia de receptores o segundos mensajeros intracelulares (Miller, 1992). El paso de calcio hacia el interior de las células puede regular la función celular por medio de interacciones con proteínas captadoras de calcio, o de proteínas quinasas sensibles a calcio y estimular respuestas biológicas como la liberación de neurotransmisores, contracción muscular, adhesión y migración celular (Brown, 1994).

### **1.5.2. Balance, regulación y movilización**

En animales adultos existe un balance entre la liberación de calcio óseo por actividad osteoclástica, y aquel que es depositado para la formación de huesos. Como todos los minerales, el calcio debe ser ingerido en la dieta (proveniente directamente del alimento o por suplementación), y la mayoría de la absorción de este mineral se da en duodeno (McDowell, 1992).

Una vaca destinada a producción de leche que pesa alrededor de 600 kg tiene aproximadamente 6 g de Ca en plasma, y de 8 a 9 g en líquido extracelular. Al producir calostro y leche utiliza 20 a 30 g de Ca cada día (Roig et al., 1999). Para evitar que este desbalance entre ingestión y utilización de calcio se refleje en sangre, y esto provoque paresia o hipocalcemia subclínica, e indirectamente enfermedades en periodo de transición (metritis, retención de placenta) la vaca debe reemplazar el calcio “perdido” utilizando sus reservas en huesos, e incrementando la capacidad de absorción por intestino. El retiro sostenido de calcio óseo sin una adecuada regulación de la calcemia puede provocar que se manifiesten problemas como osteoporosis (Barton, 1978). La principal hormona que regula la calcemia es la parathormona (PTH), que se sintetiza al disminuir los niveles de  $\text{Ca}^{++}$  sanguíneo, y promueve la salida de calcio óseo, así como también favorece la reabsorción a nivel renal. Otro regulador en la homeostasis de calcio

es el 1, 25-dihidroxicolecalciferol o calcitriol que estimula la absorción intestinal de calcio. Se produce en riñón a partir del 25-hidroxicolecalciferol o calcidiol en respuesta a la PTH. El calcitriol es determinante como parte del balance de la calcemia, regulando la cantidad de calcio absorbido por intestino. El calcio puede ingresar a circulación sanguínea pasando entre las células intestinales, o bien a través de ellas (Brown, 1994); en el primer mecanismo de absorción pueden ocurrir dos fenómenos: convección, donde el mineral se mueve junto con agua, y difusión que se vale de un gradiente electroquímico. A través de las células el calcio puede moverse por medio de canales de membrana (Miller, 1992) y al entrar al citoplasma debe ser amortiguado por proteínas específicas (calbindina, calmodulina) ya que en altas concentraciones es tóxico para las células, y es movilizado hacia su interior por medio de vesículas para las cuales no requiere amortiguación previa ya que directamente no ingresa al citoplasma; ésta última es la forma en que el calcio es secretado por glándula mamaria (Yanagawa y Lee, 1992).

En la glándula mamaria y por medio de ATPasas se moviliza al calcio hacia el aparato de Golgi de las células epiteliales para posteriormente unirse a citrato y a caseína, y entonces ser secretado por medio de vesículas (Raeymaekers y Wuytack, 1996). Otro mecanismo de movilización de calcio a través de las células es siendo intercambiado por  $\text{Na}^+$  (por cada  $\text{Ca}^+$  que sale, ingresan tres átomos de  $\text{Na}^+$ ) por medio de moléculas en la membrana celular (Domínguez et al., 1992).

### **1.5.3. Transporte y reabsorción renal**

El riñón es un órgano muy importante para mantener la homeostasis del calcio en un organismo. Este órgano reabsorbe aproximadamente 98% del calcio filtrado, pero en ciertas condiciones es capaz de eliminar concentraciones relativamente altas de este mineral a través

de la orina (Bindels, 1993). El calcio en su mayoría atraviesa el filtrado glomerular (tanto su fracción ionizada como la unida a aniones) por convección y posteriormente se reabsorbe en túbulos renales. Los riñones reabsorben más calcio (cerca de 40 veces) que el que se absorbe vía intestinal principalmente por la gran cantidad de sangre que llega al glomérulo. Si se reduce la tasa de filtrado glomerular se altera la funcionalidad glomerular para la eliminación de calcio (Riccardi y Brown, 2009).

En los túbulos proximales se reabsorbe cerca del 70% del calcio por medio de difusión y convección, atravesando el espacio intercelular junto con agua. En la porción ascendente del asa de Henle se absorbe otro 20% del calcio filtrado, sin embargo, el mecanismo aún no está claro. La mayoría del calcio al reabsorberse lo hace de forma pasiva, sin embargo, hay una parte que se absorbe de forma activa (Rouse y Suki, 1990). El sitio de regulación activa parece ser el túbulo contorneado distal, el cual reabsorbe aproximadamente 10% del calcio filtrado y es regulado por la paratohormona (PTH) (Bindels, 1993) la cual activa canales de calcio en las células principales de este tubo. Las células renales expresan un receptor sensible a calcio en sus membranas y éstos se superponen con los receptores a PTH, de esta forma el riñón puede autorregular de forma parcial la reabsorción renal de acuerdo con la concentración sanguínea de calcio (Brown y Hebert, 1996).

#### **1.5.4. Absorción intestinal**

Para ser absorbido vía intestino, el calcio se vale de dos mecanismos: transporte transcelular (saturable) o intercelular (no saturable). El porcentaje de absorción va en relación inversa con el consumo y aporte en las dietas; aquellas que son deficientes en calcio provocan aumento en su absorción (arriba del 95%), mientras que dietas ricas en este mineral presentan bajas tasas de absorción (alrededor de 40%). Sin embargo, las dietas altas en calcio son capaces de

incrementar la calcemia debido al mecanismo no saturable de entrada; y dietas con déficit en calcio mantienen niveles sanguíneos estables debido a que existe una compensación por parte de la PTH, la cual estimula resorción ósea, reabsorción renal e incrementa la síntesis de 1-25 dihidroxivitamina D (Kaneko et al., 2008). Estos mecanismos son utilizados como estrategias en alimentación al formular dietas preparto en bovinos lecheros.

El transporte de calcio que es saturable es mediado por el calcitriol y ocurre de forma predominante en el duodeno, aunque también se lleva a cabo en ciego y colon (Karbach y Feldmeier, 1993). Esta vía requiere de ingreso de calcio a células intestinales por medio de canales, movimiento y amortiguamiento al llegar al citoplasma y finalmente salida por medio de una  $\text{Ca}^+$ -ATPasa. Una actividad importante del calcitriol en el epitelio del intestino es aumentar la expresión de calbindina. Por el contrario, el mecanismo no saturable de absorción ocurre en intestino delgado y es del que se valen principalmente los organismos con deficiencias de vitamina D; para que se lleve a cabo este mecanismo la concentración de calcio en lumen intestinal es un factor determinante, y mientras ésta incrementa, el calcio disponible para ser transportado por esta vía deja de estar disponible para transportarse por este mecanismo, ya que el calcio precipita formando sales o complejos con aniones (McDowell, 1992).

Algunos factores que aumentan la tasa de absorción intestinal de calcio son meramente fisiológicos: crecimiento, gestación, lactación; dietas con déficit de calcio también incrementan la eficiencia con la que se absorbe este mineral (Lemann y Favus, 1999). Finalmente la interacción de otras hormonas como GH, PTH, testosterona, estrógenos, T3, T4 también incrementan la absorción intestinal de calcio. Los glucocorticoides por el contrario, y además

estados crónicos de acidosis metabólica (altas concentraciones de fosfatos, fitatos, oxalatos y ácidos grasos) provocan la formación de complejos con calcio (Favus y Goltzman, 2009).

#### **1.5.5. Consideraciones analíticas**

El calcio total puede ser medido por colorimetría (Fraser et al., 1987) o incluso espectrofotometría de absorción atómica; directamente en suero, plasma (heparinizado) o incluso orina. Como consideración general se debe tomar en cuenta que animales con hipoalbuminemia también pueden presentar hipocalcemia debido a que hay una fuerte correlación lineal entre estos dos analitos (Bienzle et al., 1993). La fracción ionizada puede determinarse por medio de electrodo de ion selectivo en muestra de sangre completa, plasma o suero.

#### **1.5.6. Consecuencias de hipocalcemia**

Ante las bajas concentraciones de Ca, la capacidad contráctil del músculo liso uterino e intestinal, y el funcionamiento de las células del sistema inmune disminuyen (Kimura et al., 2006). Esta condición incrementa el riesgo para la presentación de otras enfermedades como hígado graso, cetosis, retención de placenta, metritis y endometritis (Martínez et al., 2012). Las vacas que presentan alguna patología uterina después del parto tienen mayor riesgo de no quedar gestantes dentro de los primeros 120 días posparto, lo que reduce su eficiencia productiva y reproductiva e incrementa el riesgo de ser eliminadas del hato (Gilbert et al., 2005; Chamberlin et al., 2013). Por otro lado, las vacas que no presentan ningún problema al parto, pero que presentan hipocalcemia subclínica, pueden desarrollar infecciones uterinas posparto (Martínez et al., 2012). Asimismo, estas enfermedades infecciosas nos obligan a tratar a los animales y a utilizar una mayor cantidad de antibióticos, mismos que representan un

riesgo de contaminación o eliminación de la leche producida, lo que se traduce en importantes pérdidas económicas

### **1.6. Hipocalcemia Subclínica**

La hipocalcemia subclínica se ha definido como una concentración sérica de calcio menor a 2.00 mmol/L en los primeros 3 días posparto sin la presencia de signos clínicos (Goff, 2000). Este trastorno se presenta en el 25 % de las vacas primíparas y aumenta al 47 % en vacas de mayor número de partos (Reinhardt et al., 2011). En un estudio realizado por Martínez et al. (2012) utilizando vacas con alto riesgo de presentar metritis, se encontró que las que presentaron concentraciones de calcio total ( $Ca_t^{++}$ ) menores a 2.14 mmol/L presentaron metritis y reducción de la fertilidad en su primera inseminación. En otros estudios, se ha observado que la prevalencia de hipocalcemia subclínica fue del 60 y 72% en vacas primíparas y multíparas respectivamente, también se ha observado que algunas vacas presentan valores menores a 2.00 mmol/L incluso por más de 3 días (Salgado et al., 2014), por lo que se teoriza que las vacas que tardan más días en normalizar su calcemia, presentan mayor predisposición a problemas uterinos.

En E.U. y Canadá la hipocalcemia clínica (paresia posparto) ha disminuido de un 5.2% a un 2.4% en un periodo aproximado de 10 años (2002 a 2012) y en su mayoría se debe a la implementación de estrategias en alimentación, como el uso de sales aniónicas. Sin embargo, si hablamos de hipocalcemia subclínica permanece entre 25 y 47% afectando a vacas primíparas y multíparas, respectivamente (Reinhardt et al., 2011).

### **1.7. Hipomagnesemia y Relación con Hipocalcemia**

Normalmente la PTH también incrementa la reabsorción renal de magnesio, en cuadros de hipocalcemia en donde se provoca como respuesta un incremento en la producción de PTH, el magnesio sanguíneo permanecerá elevado. La hipomagnesemia provoca un bloqueo a la liberación de PTH, actuando a nivel de los receptores para esta hormona (Goff, 2006). Al unirse la PTH a su receptor se activa la adenilato ciclasa y con esto se produce fosfolipasa C, que es un segundo mensajero y resultando en la producción de diacilglicerol e inositol 4, 5-trifosfato; tanto adenilato ciclasa como fosfolipasa C requieren magnesio para tener una actividad completa. En humanos se ha visto que la hipomagnesemia es causante de hipocalcemia, y que el tratamiento administrando magnesio únicamente resuelve el cuadro clínico, a diferencia de terapias con calcio y/o vitamina D que se consideraron ineficaces (Rude et al., 1998). Las reservas de magnesio son mínimas y por tanto poco significativas, lo que implica que en animales con hiporexia/anorexia el aporte en dieta será deficiente y por tanto se presentará hipomagnesemia. El rumen es prácticamente el único sitio de absorción de magnesio, y para poder ser absorbido y entrar a circulación se vale de un mecanismo de transporte activo dependiente de sodio. Sin embargo, la solubilidad del magnesio disminuye cuando el pH ruminal sobrepasa 6.5, por lo que en alcalosis ruminal se bloquea su capacidad de absorción de este mineral y no se logrará una normomagnesemia. La concentración elevada de ácidos insaturados como palmítico, linolénico y linoleico en algunos forrajes puede provocar la formación de sales insolubles de magnesio (Cook et al., 1994).

### **1.8 Dietas Preparto**

Como parte de los manejos previos al parto se administran dietas que son deficientes en calcio, lo que lleva a las vacas a presentar un balance negativo del mineral y a una ligera hipocalcemia.

Lo anterior estimula la secreción de PTH y a su vez aumenta resorción ósea y producción de 1,25-dihidroxicolecalciferol; el flujo de calcio incrementa y el intestino está preparado para absorber calcio de forma más eficiente. Al momento del parto la salida de calcio hacia glándula mamaria es menos evidente ya que la vaca puede responder más eficientemente a una eventual hipocalcemia al tener osteoclastos ya activos, y si posterior al parto se suplementa la ración con calcio. El estímulo previo a los enterocitos ocasionado por la 1,25-dihidroxitamina D hará que éstos absorban de manera más rápida y en mayor porcentaje el calcio. Estos mecanismos pueden tardar hasta 3 días posteriores al parto para funcionar si la vaca no fue previamente sensibilizada para una elevada demanda de calcio (Goff, 2006).

### **1.9 Equilibrio Ácido/base**

Los animales requieren de un equilibrio delicado entre la concentración de hidrogeniones ( $H^+$ ) y el bicarbonato ( $HCO_3$ ). Al incrementarse la concentración sanguínea de  $H^+$ , ya sea por una ganancia de éstos o por pérdida de  $HCO_3$ , el pH sanguíneo disminuirá, llevando a los animales a un proceso de acidosis metabólica. Por el contrario, si un animal presenta pérdida de cloro (deshidratación hipotónica) ganará  $HCO_3$  como mecanismo para mantener electroneutralidad, y esto llevará al pH por arriba de su intervalo de referencia lo cual se interpreta como una alcalosis metabólica. Cualquiera de estos desequilibrios, ya sea acidosis o alcalosis, van a provocar interrupciones en múltiples procesos metabólicos, que a su vez van a llevar al animal a una manifestación clínica muy diversa en cuanto a signos que generalmente tienden a agravar los procesos de acidosis/alcalosis y de no resolverse éstos se compromete la vida del paciente.

La respiración también aporta en gran medida al equilibrio ácido/base. Mediante la respiración se lleva a cabo la eliminación de dióxido de carbono ( $CO_2$ ) lo cual generalmente incrementa como mecanismo de compensación ante una acidosis metabólica. Sin embargo, una alteración

que impida una adecuada respiración en los animales y en consecuencia un aumento en la concentración de CO<sub>2</sub> de forma primaria también ocasionará un proceso de acidosis (respiratoria) y en consecuencia una disminución en el pH sanguíneo. Un estado de alcalosis metabólica favorece la presentación de hipocalcemia, ya sea de forma clínica (paresia posparto) o subclínica, afectando tanto la eficiencia de la resorción ósea de calcio como la producción de 1, 25-dihidroxitamina D.

### **1.10 Relación Edad e Hipocalcemia**

A medida que las vacas aumentan su vida productiva, especialmente sobrepasando la tercera lactación, es más difícil que mantengan de manera constante la calcemia dentro de su normalidad. Conforme van terminando su periodo de crecimiento hacia el final de la primera lactación, el número de células óseas activas (osteoblastos y osteoclastos) disminuye, lo que significa un menor número de osteoblastos y a su vez una respuesta pobre al estímulo de PTH que pudiera estarse liberando al haber hipocalcemia (Hanai *et al.*, 1990). Además, al haber menos osteoclastos maduros, el proceso de resorción ósea tarda más tiempo, debido a que éstos deben reclutarse a partir de sus progenitores. Los receptores en intestino para 1, 25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> disminuyen al aumentar la edad (Horst *et al.*, 1990), así como también lo hacen los receptores en riñón para PTH (Hanai *et al.*, 1990).

### **1.11 Calcio, Cortisol y su Impacto en Respuesta Inmune**

El estrés del parto y el inicio de la lactación son procesos asociados con incremento en la susceptibilidad a infecciones (Chiodini *et al.*, 1984). La capacidad de respuesta en los leucocitos va disminuyendo cerca del parto, y se recupera hasta 2 a 3 semanas posteriores a éste (Kehrli y Goff, 1989). Para que los leucocitos se activen, un factor muy importante es un incremento en la concentración de calcio ionizado (Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>) intracelular, el cual actúa como

segundo mensajero de transducción de señales (Grafton y Thwaite, 2001). La magnitud de este aumento corresponde con la capacidad de respuesta y función de los leucocitos (Partiseti et al., 1994). El aumento en la demanda de  $\text{Ca}^{2+}$  que involucra la producción de calostro y leche en vacas afecta la cantidad que puede liberarse desde el retículo endoplásmico de células inflamatorias y con ello afecta la capacidad de respuesta celular. En vacas a las cuales se les removió la glándula mamaria quirúrgicamente se comprobó que en el periparto no presentaban hipocalcemia ni el mismo grado de inmunosupresión (Nonnecke *et al.*, 2003).

En animales se ha observado que hay un efecto inhibitorio entre la presencia de glucocorticoides con la absorción intestinal de calcio, sin embargo, los mecanismos moleculares para que esto suceda parecen ser poco claros (Weinstein et al., 1998). En pollos con raquitismo se observó que el calcitriol estimula la absorción intestinal de calcio e induce la síntesis de dos grupos de proteínas ligadoras (CaBP): uno soluble y otro de membrana. Al administrar acetato de cortisol se provocó una disminución en la absorción de calcio relacionada a su vez con una disminución en la CaBP soluble. El cortisol actuó de forma similar en pollos a los que se les administró 1,25-dihidroxitamina  $\text{D}_3$  lo que sugiere que el efecto del glucocorticoide no es en su mayoría afectando la síntesis de éste. La absorción de Ca está directamente relacionada con la CaBP y la actividad de fosfatasa alcalina ósea, e inversamente a la tasa de unión con la CaBP soluble (Feher y Wasseman, 1979; Hoenderop et al., 2005).

La hipocalcemia parece ser un factor “anexo” e independiente con la elevación de cortisol, pero ambos cambios a su vez repercuten de forma negativa en la capacidad de las células inflamatorias para montar una respuesta inmune ante un eventual proceso infeccioso. Por un lado, la hipocalcemia (clínica o subclínica) disminuye la cantidad de este mineral almacenado

dentro de las células y con ello baja la capacidad de respuesta (Patschan et al., 2001), y por otro el aumento en concentración de cortisol inhibe la capacidad de migración celular de los neutrófilos y disminuye la cantidad de linfocitos en circulación debido a que los secuestra en linfonodos y a su acción linfólítica (Stockham y Scott, 2013).

### **1.12 Determinación de Lactato y Glucosa en Estrés Agudo**

La demanda de glucosa en bovinos lecheros involucra una gran movilización para satisfacer las necesidades energéticas del animal, así como para el mantenimiento de la lactación. La mayoría de la glucosa utilizada se genera por gluconeogénesis, y proviene de fuentes como propionato, lactato, isobutirato, etc. Se sabe que la liberación de sustancias como catecolaminas y/o glucocorticoides en eventos de estrés, ya sea agudo o crónico (respectivamente) modifican la distribución y capacidad de utilización de la glucosa plasmática (De Koster y Opsomer, 2013).

Para evidenciar el efecto que tiene el estrés sobre la glucosa, Rand *et al.*, 2002 caracterizaron los cambios en las concentraciones de glucosa en sangre en gatos sanos expuestos a un estrés corto (baño), y se determinaron las asociaciones entre las concentraciones de glucosa, indicadores conductuales de estrés y variables sanguíneas implicadas en la hiperglucemia por estrés (glucosa plasmática, lactato, insulina, glucagon, cortisol, epinefrina, y concentraciones de norepinefrina). Las concentraciones de glucosa y lactato aumentaron rápida en respuesta al baño, sin embargo, no hubo correlación significativa entre los cambios en concentraciones medias de glucosa y las concentraciones medias de insulina o cortisol. Se propuso que la gluconeogénesis estimulada por la liberación de lactato es el mecanismo probable para la hiperglucemia en gatos sanos en este modelo de estrés agudo.

## **2. Objetivo**

Caracterizar metabolitos sanguíneos ácido/base y establecer su relación con la concentración sérica de calcio y cortisol en vacas lecheras en el periparto.

### **2.1. Objetivo(s) específico(s)**

- Comparar las determinaciones de calcio total y calcio ionizado en el monitoreo de calcemia en vacas lecheras.
- Determinar la relación entre cortisol y lactato para la utilización de ambos como indicadores de estrés en vacas lecheras.

## **3. Hipótesis**

Existe una relación entre la concentración de calcio (ionizado y total) y las concentraciones séricas de analitos ácido/base y cortisol durante el posparto en vacas.

Las concentraciones de cortisol y lactato están relacionadas, por lo que ambas pueden funcionar como indicadores de estrés en bovinos durante el posparto.

## **4. Material y métodos**

### **4.1. Descripción del área de muestreo**

El presente estudio fue realizado en el establo lechero “Las Coronelas” ubicado en el municipio de Pedro Escobedo del estado de Querétaro, México (20° 30'45.2'' norte y 100° 06'43.9'' oeste). La altitud de la región es de 1900 metros sobre el nivel del mar y el clima de la zona es templado con lluvias en verano, con una temperatura media anual de 18 °C y una temperatura máxima de 33.5 °C (Ruiz, 2015).

## **4.2. Selección de Animales**

Se tomaron muestras sanguíneas de vena coccígea en doce vacas altas productoras, de segundo parto, clínicamente sanas. Se utilizaron doce vacas altas productoras de segundo parto, clínicamente sanas de las cuales se colectaron muestras sanguíneas de la vena coccígea.

## **4.3. Toma de Muestras**

Los muestreos se realizaron a las 3, 6, 12, 18, 24, 48, 72 y 96 h posteriores al parto. Se utilizaron tanto tubos con sistema de vacío sin anticoagulante, como jeringas previamente heparinizadas utilizando sal de heparina de litio. A los tiempos ya mencionados los animales fueron contenidos en su corral, ya sea dentro de sus camas o en la trampa de alimentación (tratando de evitar el estrés previo a la toma de las muestras) y una vez inmovilizados se tomó y registró la temperatura corporal, se aplicó de forma tópica alcohol al 70% como medida de asepsia en la parte ventral de la cola. Posteriormente se ubicó la vena coccígea para realizar la punción con aguja calibre 21 y adaptador para sistema de vacío, se colocó el tubo sin anticoagulante dentro del adaptador, decantando la sangre a través de su pared para evitar hemólisis en las muestras. Posterior al llenado del tubo éste se retiró junto con la aguja y su adaptador, e inmediatamente después se puncionó nuevamente vena coccígea utilizando una aguja calibre 27 con jeringa de 1 mL de capacidad a la que previamente se le introdujo sal de heparina de litio y se llenó con 0.7 a 1mL de sangre. Los tubos sin anticoagulante fueron colocados en una gradilla a temperatura ambiente alrededor de 10 min para posteriormente almacenarse en refrigeración (4 °C), mientras que las jeringas con sangre heparinizada se colocaban en agua con hielo poniendo un tapón de goma en la punta de la aguja.

#### **4.4. Procesamiento de Muestras**

Las muestras sanguíneas sin anticoagulante fueron centrifugadas a 3500 rpm durante 10 min utilizando una centrifuga clínica para separar el suero una vez que se retrajo el coágulo (alrededor de 50 min después de la toma de la muestra). El suero se colocó en microtubos Eppendorf® con capacidad de 1.5 mL mediante decantación. Las muestras de suero fueron identificadas anotando en el tubo el número de animal y el tiempo de toma de muestra para colocarlos en congelación y posteriormente remitirlos al departamento de Patología Clínica (FMVZ UNAM) donde se determinaron concentraciones de calcio total mediante colorimetría utilizando un fotolorímetro automatizado marca DIRUI® modelo CS-T240 y electrolitos mediante un analizador por ion selectivo marca EasyLite®. Otra parte del suero fue remitida al departamento de reproducción de la FMVZ UNAM para determinar cortisol por medio de ELISA.

La sangre con heparina se procesó dentro de los primeros cinco minutos después de su obtención utilizando un gasómetro portátil (EPOC IL®) que determina los siguientes analitos: pH, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>, glucosa, lactato, bicarbonato, calcio ionizado, sodio y potasio mediante el uso de tarjetas electrónicas.

#### **4.5. Análisis de Resultados**

Se realizó un análisis de regresión lineal simple y cuadrática utilizando Excel para Windows®, tomando como variable explicativa el tiempo de muestreo después del parto, la concentración de calcio total y la de calcio ionizado, y como variables de respuesta el pH sanguíneo, concentraciones de lactato, bicarbonato, cortisol; cálculo de diferencia de iones fuertes (DIF) y ácidos no volátiles (ANV). Además, se realizó una regresión con un modelo multivariado para establecer relaciones entre analitos.

## 5. Resultados

### 5.1. Efecto del tiempo

Se determinó la existencia de una relación entre cada uno de los distintos analitos ácido/base, además de calcio (total y ionizado), glucosa y cortisol con el tiempo posparto, asimismo el tipo de relación que existiese entre ambas variables.

**Cuadro 1.** Relación del tiempo y analitos sanguíneos en vacas lecheras postparto.

Tiempo	r	Prob> t
**pH	<b>0.59</b>	< 0.0001
**HCO <sub>3</sub>	<b>0.67</b>	< 0.0001
*Lactato	<b>-0.59</b>	0.0022
*Ca <sub>i</sub> <sup>++</sup>	0.01	<b>0.666</b>
*Ca <sub>t</sub> <sup>++</sup>	0.24	0.0136
**Glucosa	-0.21	0.0009
*DIF	<b>0.75</b>	< 0.0001
**ANV	-0.26	0.0002
*Cortisol	-0.25	0.0243

Coefficientes de correlación y probabilidades del modelo de regresión lineal (\*)/cuadrático (\*\*) para la determinación del efecto del tiempo desde el parto hasta las 96 h posparto. Nivel de significancia P<0.05. Ca<sub>i</sub><sup>++</sup>: Calcio ionizado; Ca<sub>t</sub><sup>++</sup>: Calcio total; DIF: diferencia de iones fuertes; ANV: ácidos no volátiles.

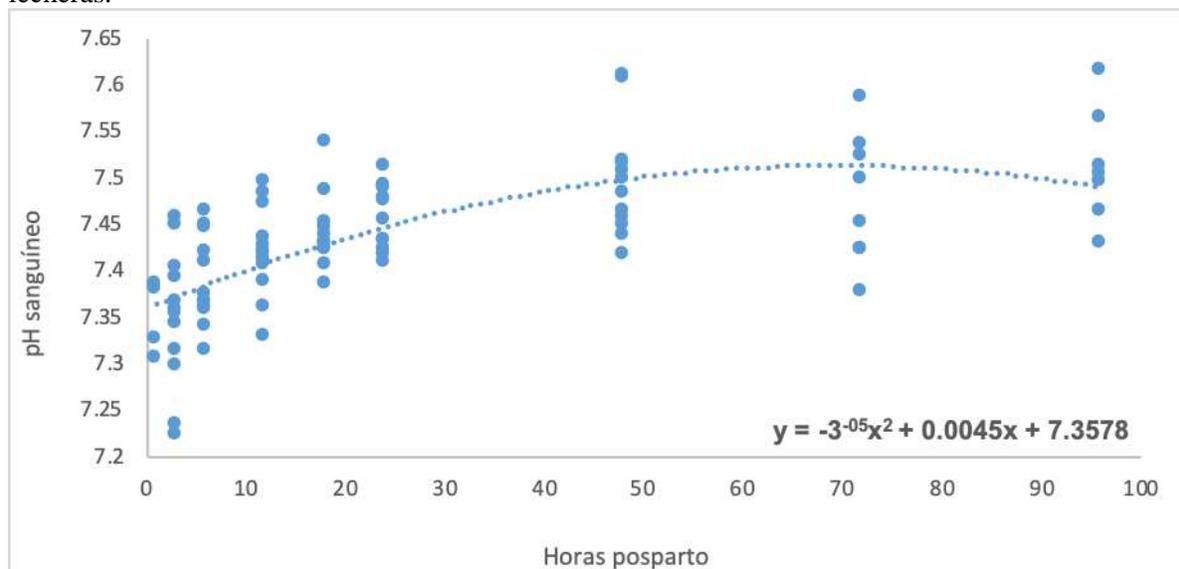
El efecto del tiempo resultó estadísticamente significativo (P < 0.05) en todos los analitos, a excepción de la fracción ionizada de calcio, lo cual indica entonces que éste no presenta cambios a través del tiempo medido. Los analitos relacionados con equilibrio ácido/base mostraron un mayor coeficiente de correlación (r); tanto el pH, el bicarbonato (con una relación cuadrática a través del tiempo); el lactato (éste último con una correlación negativa) y la diferencia de iones fuertes presentaron una relación lineal a través del tiempo. Conforme

avanza el tiempo posparto el pH sanguíneo va incrementando, al igual que el bicarbonato y la diferencia de iones fuertes; caso contrario ocurre con el lactato que disminuye su concentración a través del tiempo.

En las gráficas siguientes (1 a 4) se muestra el comportamiento de los analitos ácido/base a través del tiempo.

En primer lugar se observa que el pH sanguíneo (gráfica 1) parte de valores cercanos a 7.35 y va incrementando desde el parto hasta las 48 h posparto, para posteriormente ir perdiendo esa tendencia y mantener valores alrededor de 7.40 hasta las 96 h posparto.

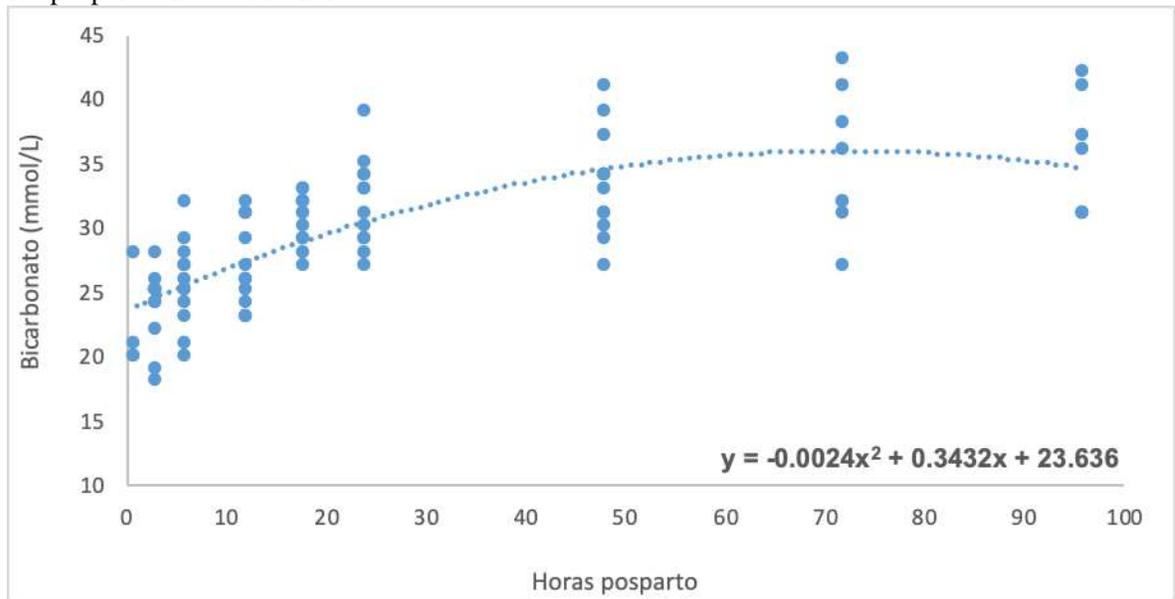
**Gráfica 1.** Comportamiento de pH sanguíneo desde el parto hasta las 96 horas posparto en vacas lecheras.



Modelo cuadrático de regresión para las variables horas postparto (eje: x) y pH sanguíneo (eje: y) en bovinos (n = 12) posparto después de 3, 6, 12, 18, 24, 48, 72 y 96 horas. Nivel de significancia  $P < 0.05$ ,  $r^2 = 0.348$ .

El comportamiento es muy similar con el bicarbonato (gráfica 2), el cual inicia en el parto con concentraciones cercanas a los 23 mmol/L y comienza a incrementarse conforme avanza el tiempo posparto, y posterior a las 48 h se observa en la gráfica que los valores permanecen alrededor de los 30 mmol/L hasta las 96 h posparto.

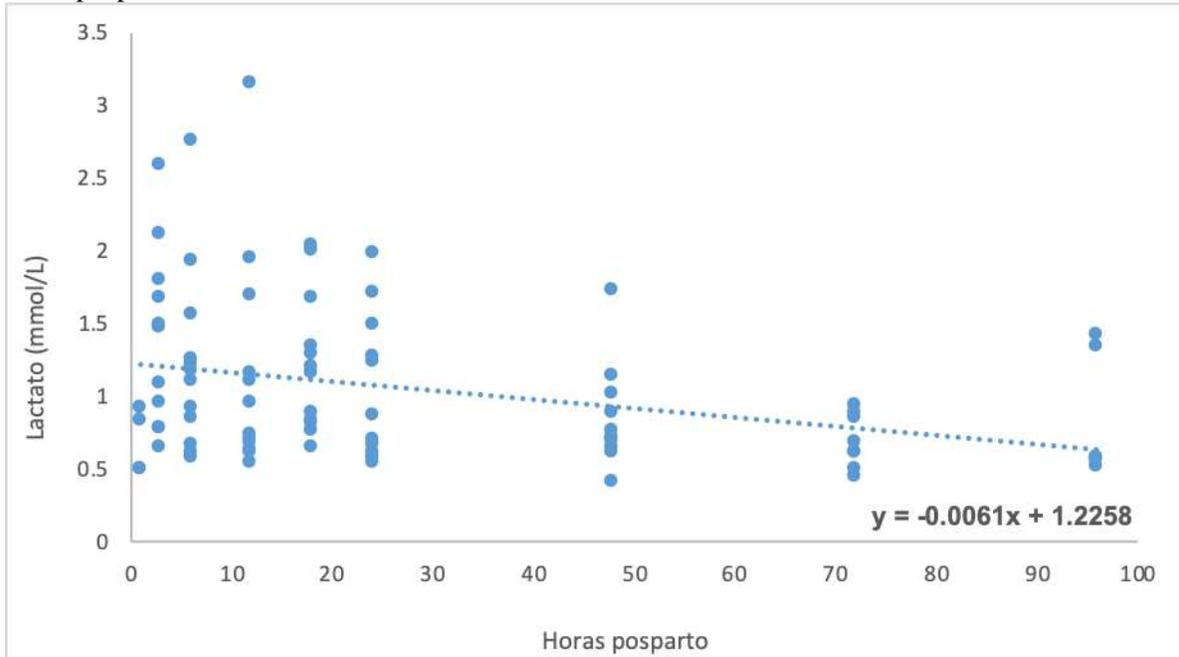
**Gráfica 2.** Comportamiento de la concentración de bicarbonato sanguíneo desde el parto hasta las 96 horas posparto en vacas lecheras.



Modelo cuadrático de regresión para las variables horas postparto (eje: x) y bicarbonato sanguíneo (eje: y) en bovinos (n = 12) posparto después de 3, 6, 12, 18, 24, 48, 72 y 96 horas. Nivel de significancia  $P < 0.05$ ,  $r^2 = 0.449$ .

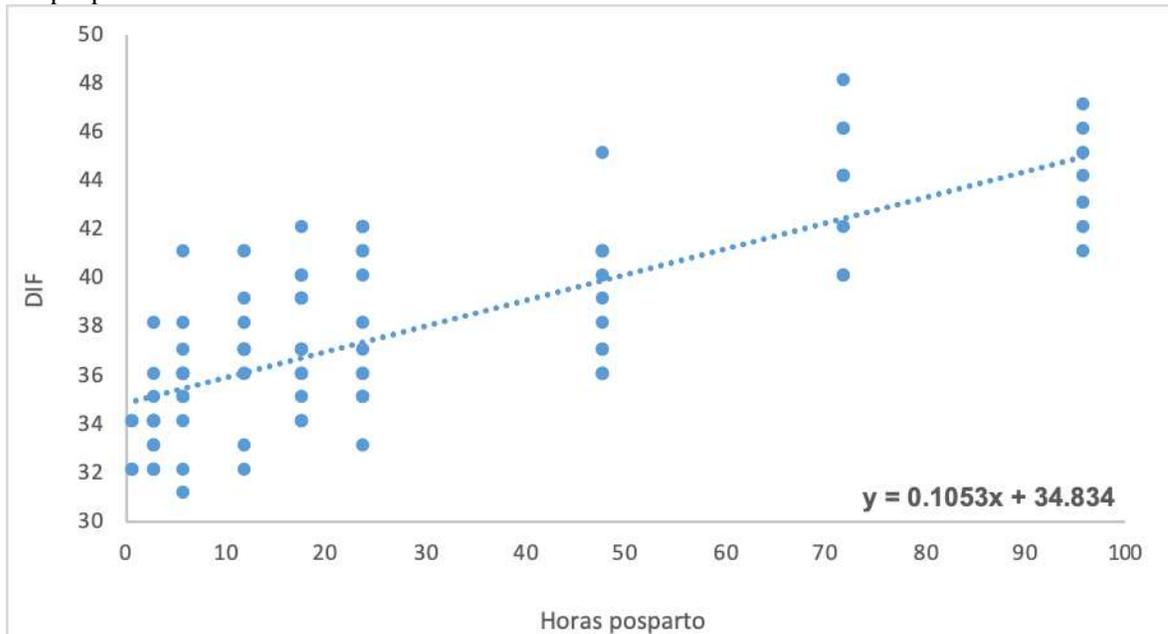
La dinámica de lactato (gráfica 3), muestra un comportamiento lineal, su concentración (mmol/L) en el parto fue cercana a 1.2 mmol/L y fue disminuyendo hasta las 96 h en donde el lactato fue inferior a 1.0 mmol/L. La diferencia de iones fuertes (sodio – cloro) (gráfica 4) que también se comporta de manera lineal y en el parto se observa cercana a un valor de 35 mmol/L va incrementándose hasta las 96 h donde supera los 44 mmol/L.

**Gráfica 3.** Comportamiento de la concentración de lactato sanguíneo desde el parto hasta las 96 horas postparto en vacas lecheras.



Modelo lineal de regresión para las variables horas postparto (eje: x) y lactato sanguíneo (eje: y) en bovinos (n = 12) postparto después de 3, 6, 12, 18, 24, 48, 72 y 96 horas. Nivel de significancia  $P < 0.05$ ,  $r^2 = 0.348$ .

**Gráfica 4.** Comportamiento en la diferencia de iones fuertes sanguíneos desde el parto hasta las 96 horas postparto en vacas lecheras.



Modelo lineal de regresión para las variables horas postparto (eje: x) y diferencia de iones fuertes (eje: y) en bovinos (n = 12) postparto después de 3, 6, 12, 18, 24, 48, 72 y 96 horas. Nivel de significancia  $P < 0.05$ ,  $r^2 = 0.562$ .

En las gráficas anteriormente descritas se observa que las vacas en el parto mostraron cambios correspondientes con acidosis metabólica con un componente mixto (disminución de pH, bicarbonato y diferencia de iones fuertes; aumento de lactato) que conforme avanza el parto y en las mediciones realizadas hasta las 96 h fue evidenciada una cinética que demostraba la aparente resolución de dicho estado, el incremento de pH en paralelo con el bicarbonato, además de una disminución de lactato y aumento de la diferencia de iones fuertes (depleción y/o redistribución de cloro).

## 5.2. Calcio total y analitos ácido/base

En la tabla 2 se presenta el calcio total (mmol/L) y se muestra una relación significativa ( $P < 0.05$ ) con el bicarbonato, lactato y la diferencia de iones fuertes, pero no con el pH sanguíneo ni con los ácidos no volátiles. Aunque algunos analitos ácido/base sí muestran una relación lineal con las concentraciones de calcio total, se observa que el coeficiente de correlación en todos los casos es muy bajo, lo que indica que el impacto sobre el calcio total que tienen las determinaciones de equilibrio ácido/base son muy bajas.

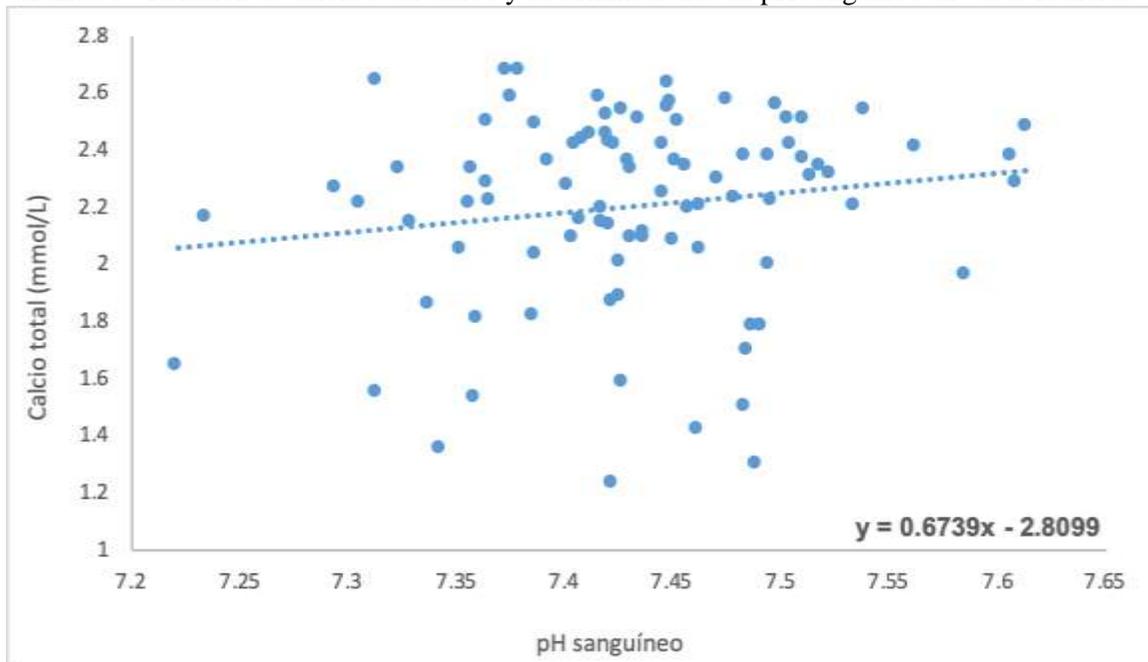
**Cuadro 2.** Relación de calcio total con analitos sanguíneos en vacas lecheras postparto

Calcio total	r	Prob> t
pH	0.15	<b>0.1558</b>
HCO <sub>3</sub>	0.26	0.0136
Lactato	-0.06	0.0022
DIF	0.25	0.0184
ANV	-0.19	<b>0.0819</b>

Coefficientes de correlación y probabilidades en un modelo de regresión lineal para la determinación del cambio en concentración de calcio total y analitos sanguíneos. Nivel de significancia  $P < 0.05$ . DIF: diferencia de iones fuertes; ANV: ácidos no volátiles.

La gráfica 5 corresponde con pH sanguíneo y medición de calcio total, muestra elevada dispersión de las distintas determinaciones de calcio, así como una  $P > 0.05$ , la cual indica que no hay una relación lineal entre ambos analitos, por lo que en los tiempos medidos no hay una modificación de calcio total en función a los cambios en pH sanguíneo.

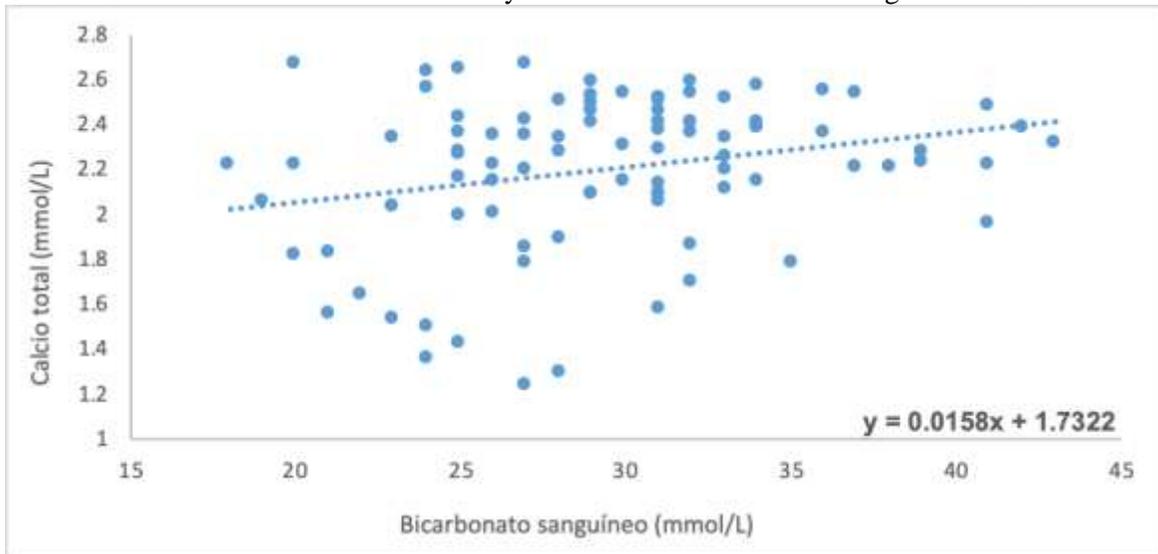
**Gráfica 5.** Relación de calcio total sérico y determinaciones de pH sanguíneo en vacas lecheras.



Modelo lineal de regresión entre las variables pH sanguíneo (eje: x) y calcio total (eje: y) en bovinos ( $n = 12$ ). Nivel de significancia  $P < 0.05$ ,  $r^2 = 0.022$ .

En cuanto a la relación entre el calcio total y bicarbonato sanguíneo (gráfica 6) se observó una relación lineal positiva ( $P < 0.05$ ). Sin embargo, el coeficiente de correlación es muy bajo lo que indica que la dispersión es alta y la interacción de ambos no es útil como modelo.

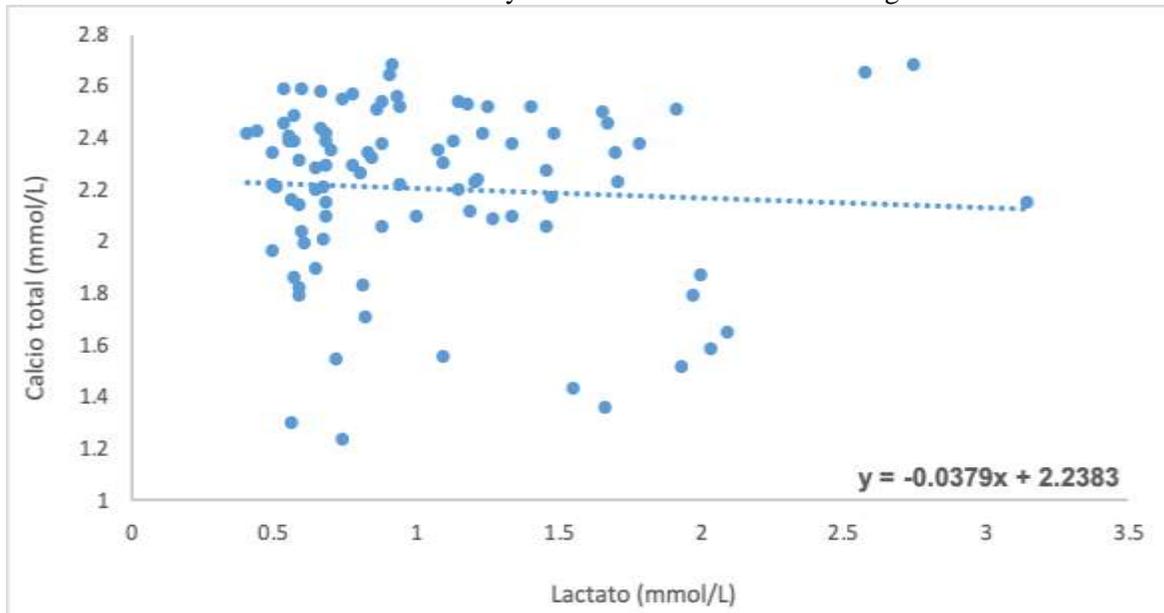
**Gráfica 6.** Relación de calcio total sérico y mediciones de bicarbonato sanguíneo en vacas lecheras.



Modelo lineal de regresión entre las variables bicarbonato sanguíneo (eje: x) y calcio total (eje: y) en bovinos (n = 12). Nivel de significancia  $P < 0.05$ ,  $r^2 = 0.068$ .

El lactato guarda una relación lineal significativa ( $P = 0.0022$ ) con calcio total, sin embargo, la relación entre ambos es inversa y su coeficiente de regresión es sumamente bajo lo que corresponde con la elevada dispersión que se observa y que nuevamente indica que la interacción de ambos analitos (figura 7).

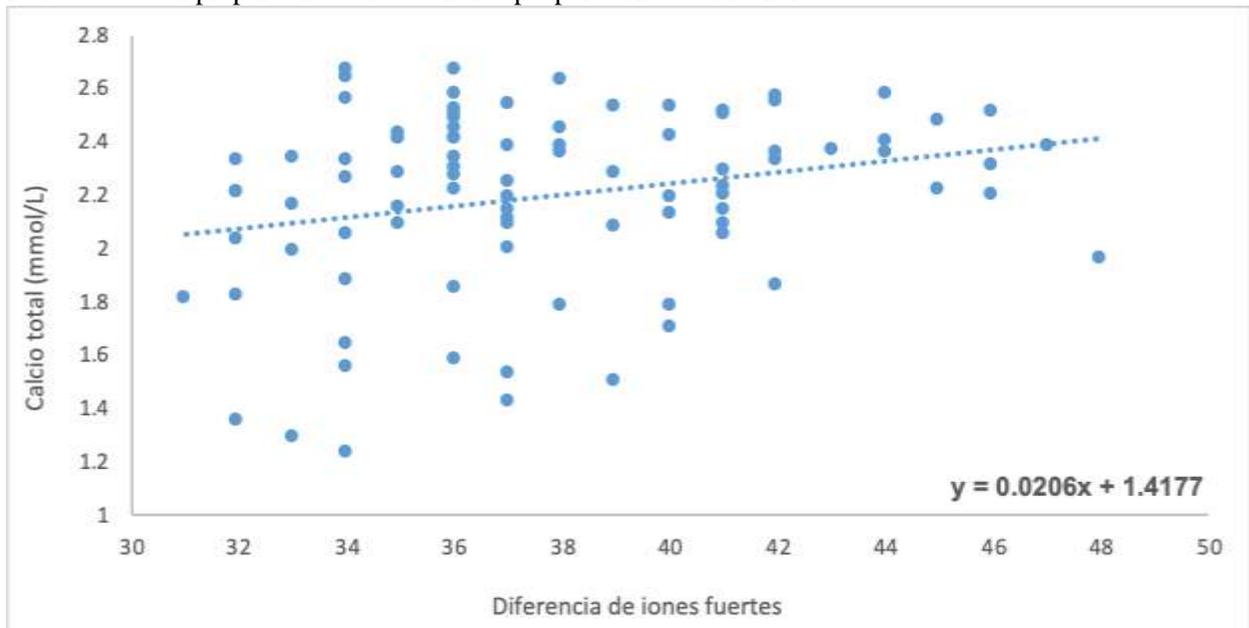
**Gráfica 7.** Relación de calcio total sérico y determinaciones de lactato sanguíneo en vacas lecheras.



Modelo lineal de regresión entre las variables lactato sanguíneo (eje: x) y calcio total (eje: y) en bovinos (n=12). Nivel de significancia  $P < 0.05$ ,  $r^2 = 0.004$ .

En cuanto a la diferencia de iones fuertes y el calcio total, estos sí presentan una relación significativa ( $P = 0.0184$ ) en un modelo lineal; en la gráfica 8 se observa la dispersión de las determinaciones que corresponde con un coeficiente de correlación bajo.

**Gráfica 8.** Comportamiento de calcio total sérico en distintas determinaciones de diferencia de iones fuertes desde el parto hasta las 96 horas posparto en vacas lecheras.



Modelo lineal de regresión para las variables diferencia de iones fuertes (eje: x) y calcio total (eje: y) en bovinos posparto (n=12). Nivel de significancia  $P < 0.05$ ,  $r^2 = 0.062$ .

### 5.3. Calcio ionizado y analitos ácido/base

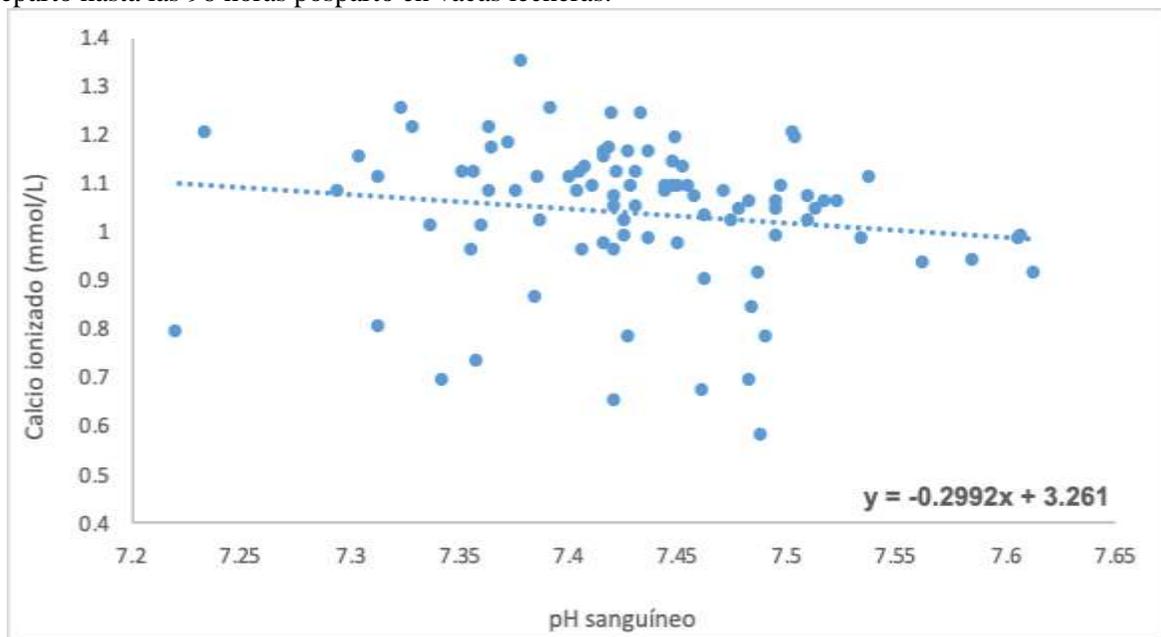
En el cuadro 3 se enumeran los coeficientes de correlación para los analitos ácido/base y el calcio ionizado, todos ellos con una correlación muy baja ( $P > 0.05$ ). Se observa además que para ninguno de los analitos listados la correlación resulta significativa estadísticamente, ya que el valor de P se mantiene  $> 0.05$  lo que indica que los cambios del estado ácido/base en los animales muestreados no están asociados a la fracción libre de calcio en sangre.

**Cuadro 3.** Relación de calcio ionizado con analitos sanguíneos en vacas lecheras posparto.

<b>Calcio ionizado</b>	<b>R</b>	<b>Prob&gt; t </b>
pH	-0.15	<b>0.1518</b>
HCO <sub>3</sub>	0.04	<b>0.6849</b>
Lactato	-0.07	<b>0.5203</b>
DIF	0.04	<b>0.7214</b>
ANV	-0.17	<b>0.1360</b>

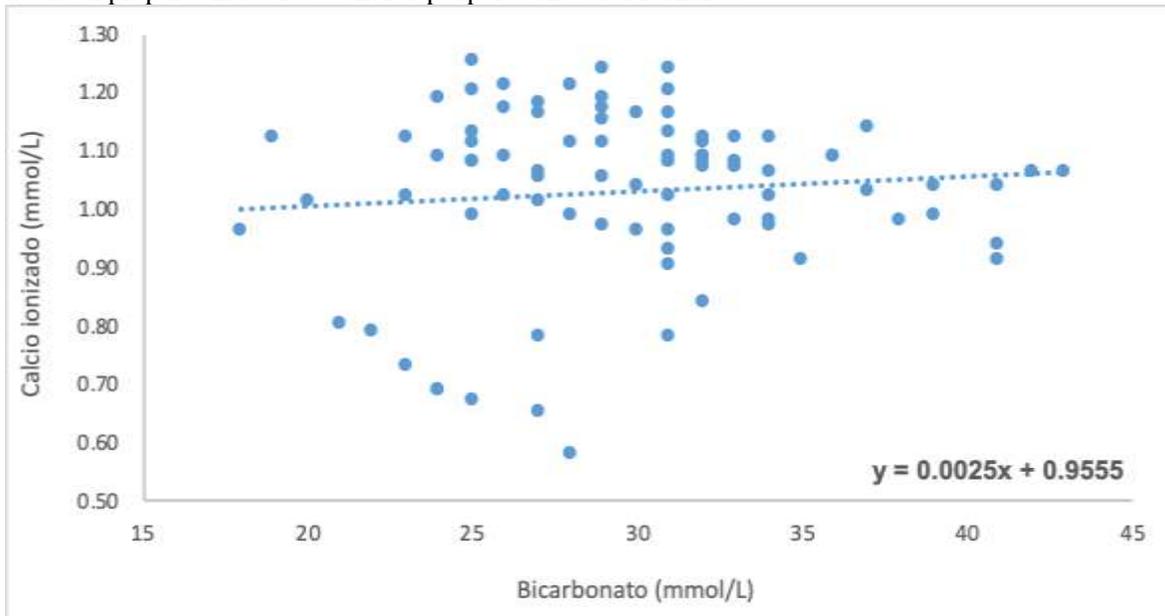
Coefficientes de correlación y probabilidades en un modelo de regresión lineal para la determinación del cambio en concentración de calcio ionizado y analitos sanguíneos. Nivel de significancia P<0.05. DIF: diferencia de iones fuertes; ANV: ácidos no volátiles.

**Gráfica 9.** Comportamiento de calcio ionizado en distintas determinaciones de pH sanguíneo desde el parto hasta las 96 horas posparto en vacas lecheras.



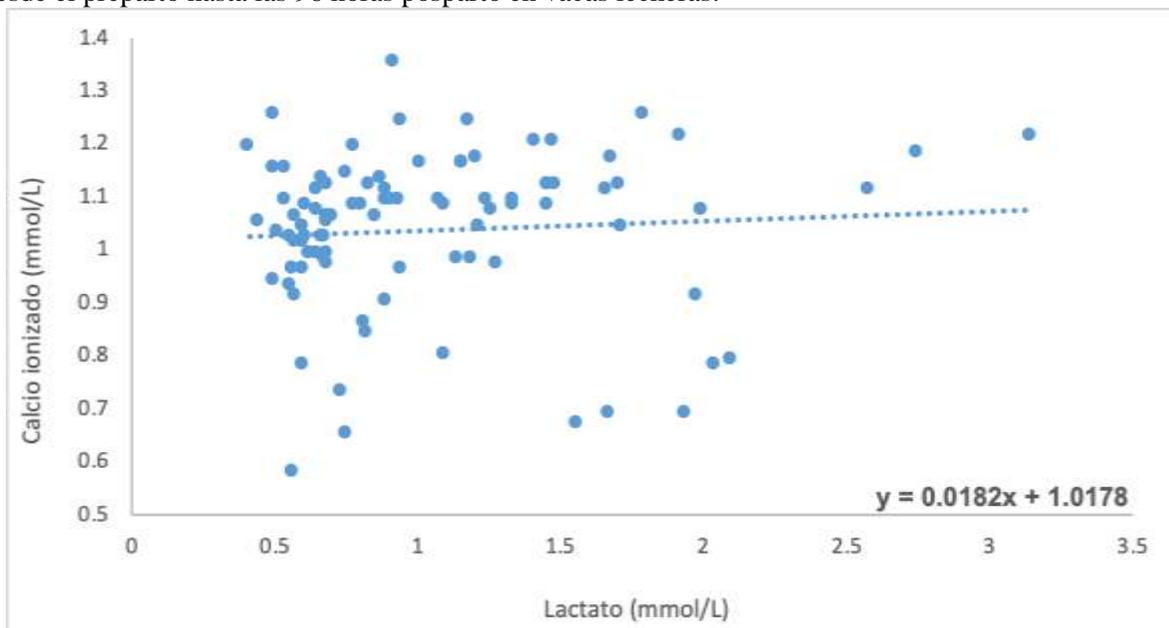
Modelo lineal de regresión para las variables pH sanguíneo (eje: x) y calcio ionizado (eje: y) en bovinos (n = 12) posparto después de 3, 6, 12, 18, 24, 48, 72 y 96 horas. Nivel de significancia P<0.05, r<sup>2</sup>=0.022.

**Gráfica 10.** Comportamiento de calcio ionizado en distintas determinaciones de bicarbonato sanguíneo desde el parto hasta las 96 horas posparto en vacas lecheras.



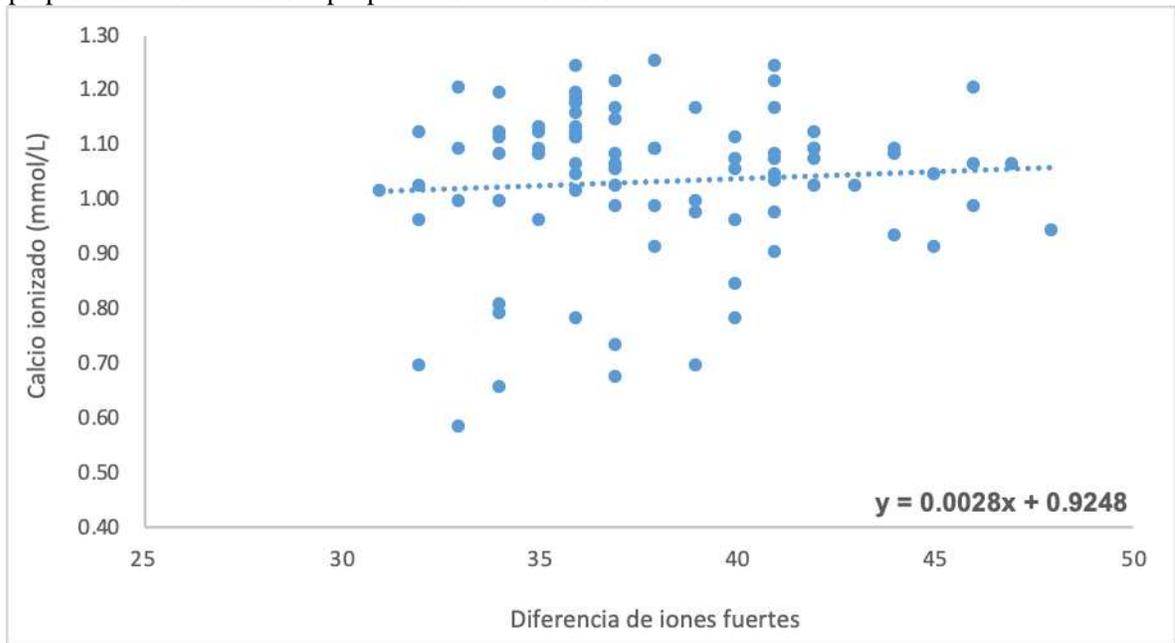
Modelo lineal de regresión para las variables bicarbonato (eje: x) y calcio ionizado (eje: y) en bovinos (n = 12) posparto después de 3, 6, 12, 18, 24, 48, 72 y 96 horas. Nivel de significancia  $P < 0.05$ ,  $r^2 = 0.0016$ .

**Gráfica 11.** Comportamiento de calcio ionizado en distintas determinaciones de lactato sanguíneo desde el parto hasta las 96 horas posparto en vacas lecheras.



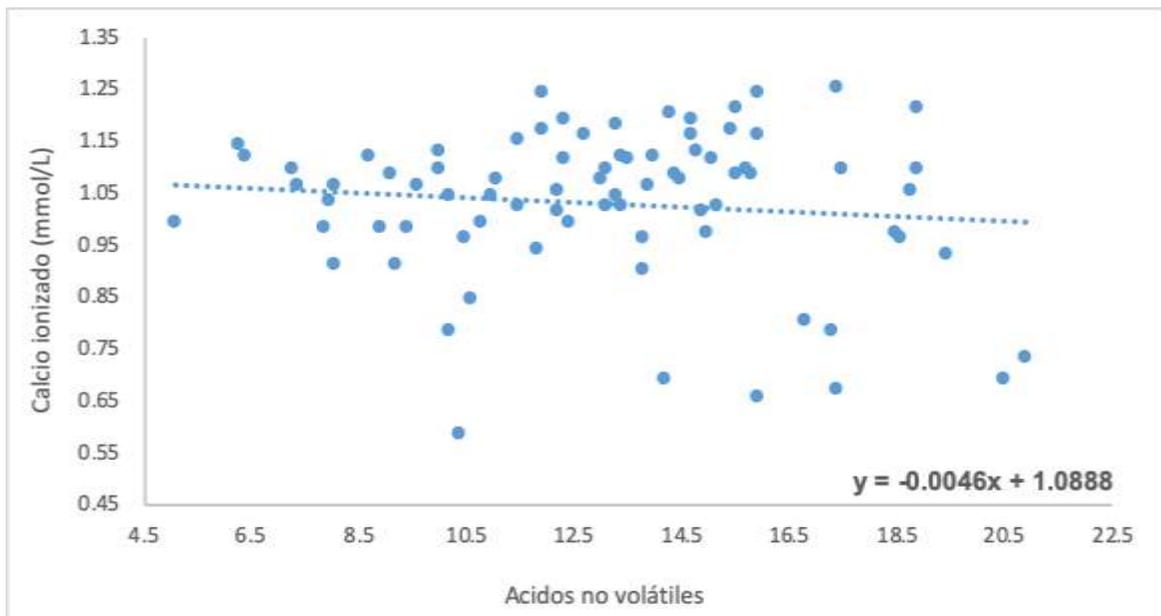
Modelo lineal de regresión para las variables lactato (eje: x) y calcio ionizado (eje: y) en bovinos (n = 12) posparto después de 3, 6, 12, 18, 24, 48, 72 y 96 horas. Nivel de significancia  $P < 0.05$ ,  $r^2 = 0.005$ .

**Gráfica 12.** Comportamiento de calcio ionizado y determinaciones de diferencia de iones fuertes desde el parto hasta las 96 horas posparto en vacas lecheras.



Modelo lineal de regresión para variables diferencia de iones fuertes (eje: x) y calcio ionizado (eje: y) en bovinos (n = 12) posparto después de 3, 6, 12, 18, 24, 48, 72 y 96 horas. Nivel de significancia  $P < 0.05$ ,  $r^2 = 0.002$ .

**Gráfica 13.** Comportamiento de calcio ionizado y determinación de ácidos no volátiles desde el parto hasta las 96 horas posparto en vacas lecheras.

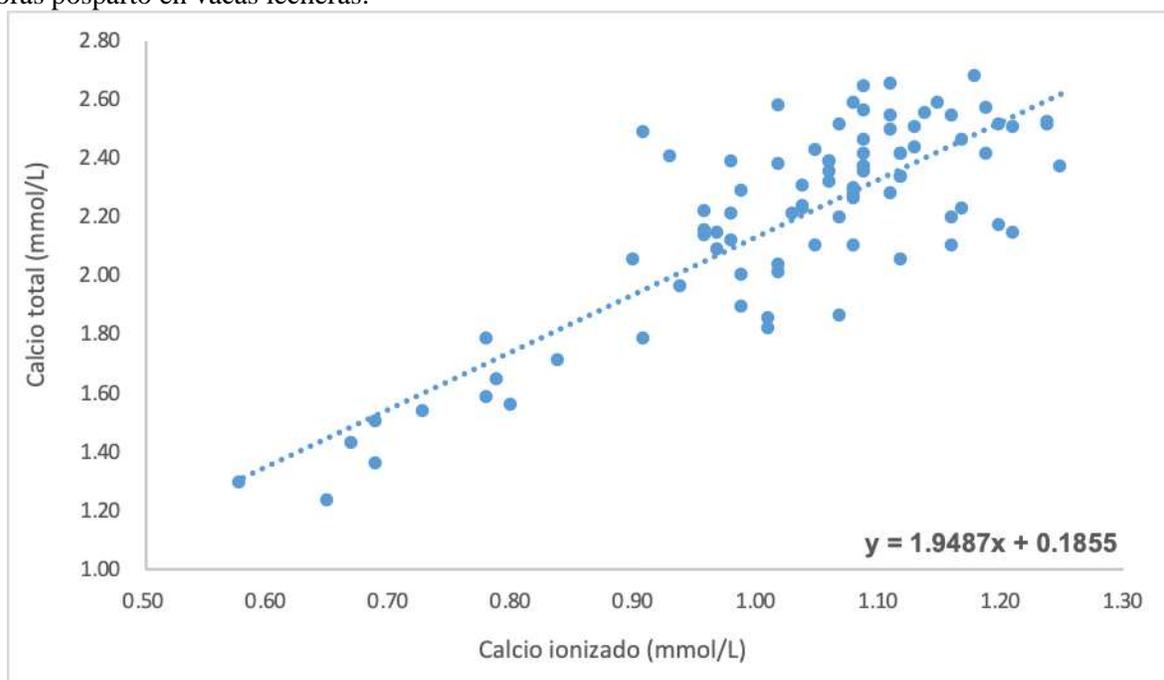


Modelo lineal de regresión para las variables ácidos no volátiles (eje: x) y calcio ionizado (eje: y) en bovinos (n = 12) posparto después de 3, 6, 12, 18, 24, 48, 72 y 96 horas. Nivel de significancia  $P < 0.05$ ,  $r^2 = 0.029$ .

#### 5.4. Calcio total y calcio ionizado

En la gráfica 14 se muestra la estrecha relación que tienen el calcio total y calcio ionizado. Se observa que hay una relación directa, con un coeficiente de correlación elevado ( $r = 0.829$ ) y una  $P < 0.0000$ ; las determinaciones muestran muy poca dispersión. Ambos analitos guardan una marcada relación y el cambio en la concentración de calcio total impacta de forma positiva en la concentración sanguínea de calcio ionizado en periparto de bovinos.

**Gráfica 14.** Medición de calcio total sérico y calcio ionizado sanguíneo desde el preparto hasta las 96 horas posparto en vacas lecheras.



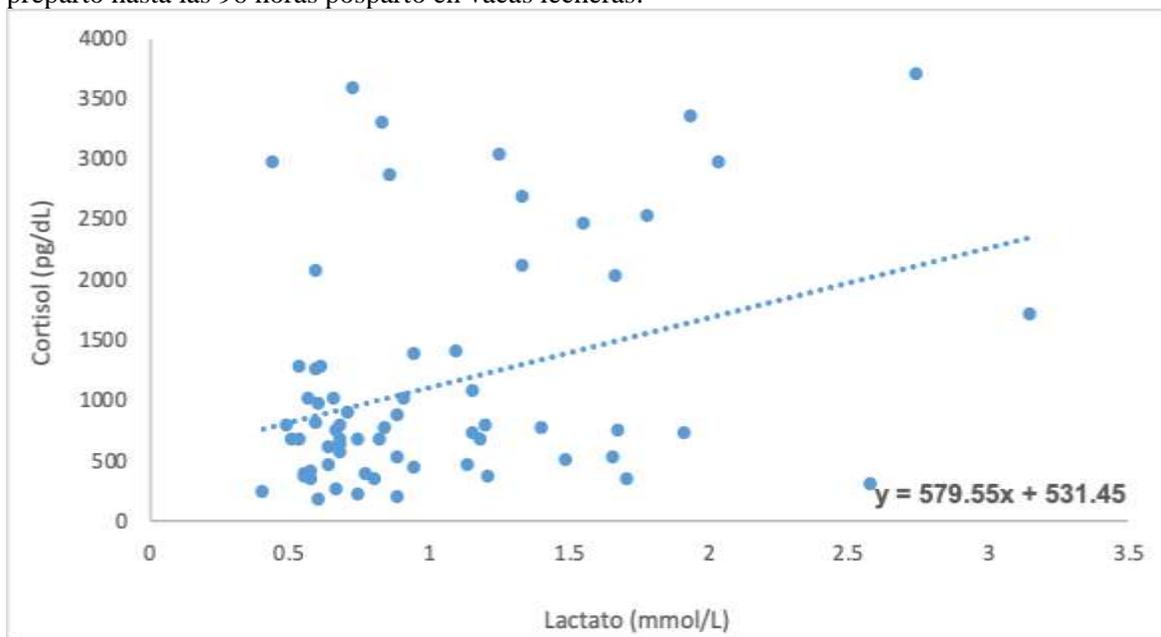
Modelo lineal de regresión para las variables calcio ionizado (eje: x) y calcio total (eje: y) en bovinos ( $n = 12$ ) posparto después de 3, 6, 12, 18, 24, 48, 72 y 96 horas. Nivel de significancia  $P < 0.05$ ,  $r^2 = 0.689$ .

#### 5.5. Cortisol y lactato

Existe evidencia estadística ( $P = 0.004$ ) para determinar que hay una relación directa entre la concentración de cortisol y lactato durante el periparto de vacas lecheras. Aunque al haber relación entre ambas variables se demuestra que el incremento de lactato corresponde a su vez

con elevación de cortisol, hay marcada dispersión, y esto indica que la asociación de ambos analitos como modelo no es conveniente.

**Gráfica 15.** Comportamiento de cortisol sérico y determinaciones de lactato sanguíneo desde el parto hasta las 96 horas posparto en vacas lecheras.



Modelo lineal de regresión para las variables lactato (eje: x) y cortisol (eje: y) en bovinos (n = 12) posparto después de 3, 6, 12, 18, 24, 48, 72 y 96 horas. Nivel de significancia  $P < 0.05$ ,  $r^2 = 0.119$ .

## 6. Discusión

La concentración de calcio total (medido por colorimetría) en los tiempos de muestreo mostró una fuerte relación con las determinaciones de calcio ionizado por gasometría.

El calcio en la circulación está distribuido en tres fracciones en el organismo: calcio libre (ionizado), unido a proteínas y unido a aniones no proteicos (fosfatos, citrato, lactato). La fracción ionizada es aquella biológicamente activa y representa aproximadamente un 50 – 60% del calcio total en animales. Experimentalmente el calcio puede medirse por diversas metodologías, entre ellas la espectrofotometría (Kimura et al., 2006, Martínez et al., 2012); sin embargo, para el seguimiento de la calcemia en bovinos lecheros en condiciones de campo usualmente la determinación de calcio total se realiza por medio de colorimetría (Westgard et

al., 1999), el cual es un método de medición barato y relativamente disponible, sin embargo se debe considerar que la presencia de hemólisis en el suero, atribuible a la obtención o manejo de la muestra, así como el tiempo de almacenamiento puede causar interferencia analítica y con ello falsos incrementos en los valores obtenidos (Schenk y Chew, 2008), como resultado se puede estar subestimando la incidencia de hipocalcemia en los animales; Otro factor a considerar es, que una vez obtenidas las muestras, éstas deben ser transportadas a un laboratorio que cuente con equipos especializados (fotocolorímetros), que esté validado para el procesamiento de muestras biológicas de animales y que tenga certificados de calidad; si bien las muestras pueden enviarse por paquetería a cualquier destino, el tiempo y las condiciones de envío pueden no ser óptimos para la preservación de las muestras y la confiabilidad de los resultados (Boyanton y Blick, 2002).

Con la realización de este estudio se ha demostrado la estrecha relación que existe entre la fracción ionizada de calcio (determinada por ion selectivo mediante un gasómetro portátil) y la medición de calcio total (que se mide por colorimetría), de tal forma que ambos analitos y métodos de medición pueden resultar válidos para el seguimiento de la calcemia en el posparto de vacas productoras de leche. Al utilizar de manera indistinta ambos métodos de medición se debe considerar entonces la ventaja en el uso de un gasómetro portátil, que puede ser adquirido por parte de un productor que cuente con un número de animales que justifique la inversión, o bien, de un grupo de productores, con la ventaja de que no requiere una instalación especializada y la capacitación necesaria para el uso del equipo es mínima, además el tiempo de análisis de las muestras y la cantidad de sangre necesaria también representa una ventaja, ya que las muestras se pueden obtener y procesar de forma inmediata y el volumen que se requiere no supera 1 mL para la obtención de calcio ionizado y analitos ácido/base tanto metabólicos como respiratorios; de esta forma se puede realizar más rápidamente un diagnóstico de

hipocalcemia subclínica, así como un seguimiento al estado metabólico general de los animales. La determinación de calcio ionizado brinda más información de la calcemia, ya que es una medición directa del calcio biológicamente disponible, sin embargo, debe considerarse que factores como alteraciones en el pH sanguíneo (acidosis/alcalosis metabólica) también pueden causar cambios en la distribución del calcio; en casos de acidosis metabólica el calcio ionizado se incrementa en circulación mientras que en estado de alcalosis metabólica sucede lo contrario (Stockham y Scott, 2013).

No se encontró relación entre la determinación de lactato y calcio ionizado, misma que sí ha sido reportada previamente por Larsen et al. (2001); sin embargo, hay que considerar que en ese estudio las muestras se tomaron en vacas de varias razas (no raza Holstein) y durante únicamente las primeras 12 h del posparto, además bajo manejo y clima distintos. Las condiciones anteriormente mencionadas pueden ser factores que se deben considerar para las diferencias en resultados entre los estudios. También se ilustra la cinética de los valores ácido/base y cortisol en sangre de bovinos lecheros durante el posparto, y la relación e impacto que pueden o no tener sobre ambas fracciones de calcio sanguíneo (total y ionizado); el cortisol ha sido medido y se ha estudiado la relación entre éste y la presentación de hipocalcemia clínica o subclínica, reportando una mayor elevación de cortisol al manifestar un cuadro clínico que cuando los animales con hipocalcemia no presentan signos manifiestos (Goff y Horst, 1997). Sin embargo la correlación que se hizo en el trabajo citado sólo toma en cuenta la presentación de hipocalcemia, sin mencionar valores de calcio en sangre, por lo que la elevación de cortisol que reportan en los animales puede ser consecuencia de la manifestación de la enfermedad, más que un factor que permita ligar la dinámica de la calcemia en periparto con la del cortisol en el mismo periodo; además las determinaciones fueron realizadas tres días previos y tres posteriores al parto. En nuestro trabajo los periodos de tiempo en que se

obtuvieron las muestras para medir tanto cortisol como calcio fueron más estrechos y enfocándose en mayor medida en la dinámica de ambos analitos en el posparto.

Los valores ácido/base (pH sanguíneo, bicarbonato, lactato, diferencia de iones fuertes) son correspondientes entre sí, ya que la elevación que muestra el pH sanguíneo desde el parto hasta las 48 h posparto y un posterior mantenimiento se refleja de forma casi idéntica en una elevación y mantenimiento de bicarbonato, en consecuencia vemos una disminución de lactato de forma constante, así como el incremento que presenta la diferencia de iones fuertes se traduce en una redistribución de sodio y cloro para disminuir la concentración de hidrogeniones en circulación. Los cambios en analitos ácido/base pueden corresponder con modificaciones en la dieta en el posparto, además de que el aumento de pH sanguíneo se da en relación con la disminución de lactato, que puede haberse incrementado a consecuencia de un cambio en la población bacteriana del rumen (Goff y Horst, 1997), así como producción por parte de los músculos al ocurrir las contracciones durante el parto. Las modificaciones en valores sanguíneos ácido/base han sido estudiadas en el parto como consecuencia de la alimentación, no obstante, se menciona que no hay cambios medibles en circulación sanguínea al determinar pH, bicarbonato y diferencia de iones fuertes (Van Mosel et al., 1993). En nuestro trabajo hay evidencia de que estos cambios ocurren, sin embargo, no hay un parámetro para correlacionar con el posparto y establecer la posible relación con la dieta. Tanto el pH sanguíneo como el bicarbonato muestran correspondencia a una recuperación de un estado de acidosis metabólica, la cual puede deberse a incremento en ácidos no volátiles (lactato), o bien desequilibrio electrolítico entre sodio y cloro (hipercloremia); esto a su vez refleja que conforme avanza el posparto, el cloro ( $\text{Cl}^-$ ) va perdiéndose o redistribuyéndose al interior de las células, o bien, los animales van ganando sodio ( $\text{Na}^+$ ) al redistribuirlo hacia el líquido extracelular.

## 7. Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente estudio permiten visualizar la dinámica de analitos sanguíneos, así como si existe relación e impacto de las alteraciones ácido/base en la calcemia de vacas lecheras altas productoras durante el posparto, lo cual puede a su vez incrementar la eficiencia para la detección de casos de hipocalcemia subclínica, así como las enfermedades que se presentan como consecuencia de ésta última. Además, se utilizó con éxito un gasómetro portátil como herramienta diagnóstica para la detección de forma rápida de los animales que presenten hipocalcemia sin la manifestación de signos clínicos; el gasómetro portátil cuantifica la fracción biológicamente activa de calcio en sangre y además proporciona un perfil general de salud de los animales al obtener parámetros ácido/base y de equilibrio hídrico con un mínimo de muestra y tiempo de análisis inmediato.

La estrecha relación que se encontró entre la fracción ionizada de calcio y la medición de calcio total es útil para demostrar que ambos parámetros y ambos métodos de medición resultan igualmente válidos para el seguimiento de la calcemia en vacas lecheras, además el determinar calcio ionizado por medio de un gasómetro portátil permite un mejor manejo de muestra y una lectura mucho más rápida de la concentración de calcio ionizado, incluso que se tomaran medidas de prevención y/o manejo de hipocalcemia al instante de la detección, en contraparte de remitir muestras de sangre a un laboratorio, donde el transporte, almacenamiento y tiempo de emisión de resultados pueden representar una desventaja para una detección oportuna de vacas con hipocalcemia subclínica.

Si bien nuestros resultados mostraron una relación lineal directa entre la concentración de lactato y cortisol (ambos analitos incrementaron en los tiempos medidos), las condiciones bajo las que se realizó nuestro estudio también marcaron que hay alta dispersión entre analitos y por

lo tanto no es tan conveniente extrapolar la información de un analito utilizando al otro como referencia, y en consecuencia sustituir la medición de cortisol para detectar estrés en las vacas lecheras, por lo menos en las primeras horas posparto; esta información se puede retomar utilizando un mayor número de animales, o bien, realizar nuevas determinaciones en otras etapas productivas.

## **8. Referencias**

1. Arck P, Hansen PJ, Mulac Jericevic B, Piccinni MP, Szekeres- Bartho J. 2007. Progesterone during pregnancy: endocrine-immune cross talk in mammalian species and the role of stress. *American journal of reproductive immunology*, 58: 268-279.
2. Banks KL. 1982. Host defense in the newborn animal. *Journal of American Veterinary Medical Association* 181:1053.
3. Barton JC, Conrad, ME, Harrison L, Nuby S. 1978. Effects of calcium on the absorption and retention of lead. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 91: 366-376
4. Bauman DE, Currie WB. 1980. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *Journal of Dairy Science*, 63:1514-1529.
5. Beagley JC, Whitman KJ, Baptiste KE, Scherzer J. 2010. Physiology and treatment of retained fetal membranes in cattle. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24: 261-268.
6. Bienzle D, Jacobs RM, Lumsden JH. 1993. Relationship of serum total calcium to serum albumin in dogs, cats, horses and cattle. *The Canadian Veterinary Journal*, 34:360.

7. Bell AW. 1995. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of Animal Science*, 73: 2804-2819.
8. Bell AW, Bauman DE. 1997. Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 2: 265-278.
9. Bergman EN. 1990. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological Reviews*, 70: 567-590.
10. Bertics, SJ, Grummer, RR, Cadorniga-Valino C, Stoddard EE. 1992. Effect of prepartum dry matter intake on liver triglyceride concentration and early lactation. *Journal of Dairy Science*, 75: 1914-1922.
11. Bienzle D, Jacobs RM, Lumsden JH. 1993. Relationship of serum total calcium to serum albumin in dogs, cats, horses and cattle. *The Canadian Veterinary Journal*, 34: 360.
12. Bindels RJ. 1993. Calcium handling by the mammalian kidney. *Journal of Experimental Biology*, 184: 89-104.
13. Bobe G, Young JW, Beitz DC. 2004. Invited review: pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 87: 3105-3124.
14. Brown EM. 1994. Homeostatic mechanisms regulating extracellular and intracellular calcium metabolism. *The parathyroid*, 15-54.
15. Brown EM, Hebert SC. 1996. A cloned extracellular Ca<sup>2+</sup> sensing receptor: Molecular mediator of the actions of extracellular Ca<sup>2+</sup> on parathyroid and kidney cells? *Kidney International*, 49: 1042-1046.
16. Boyanton BL, Blick KE. 2002. Stability studies of twenty-four analytes in human plasma and serum. *Clinical Chemistry*, 48: 2242-2247.

17. Cadórniga-Valiño C, Grummer RR, Armentano LE, Donkin, SS, Bertics SJ. 1997. Effects of fatty acids and hormones on fatty acid metabolism and gluconeogenesis in bovine hepatocytes. *Journal of Dairy Science*, 80: 646-656.
18. Capen CC, Rosol TJ. 1989. The calcium regulating hormones: parathyroid hormone, calcitonin, and cholecalciferol. *Veterinary Endocrinology and Reproduction*, 3: 60-130.
19. Capuco AV, Wood DL, Elsasser TH, Kahl S, Erdmann RA, Van Tassell CP, Lefcourt A, Piperova LS. 2001. Effect of somatotropin on thyroid hormones and cytokines in lactating dairy cows during ad libitum and restricted feed intake. *Journal of Dairy Science*. 84: 2430-2439.
20. Cavestany D, Kulcsár M, Crespi D, Chilliard Y, La Manna A, Balogh O, Keresztes M, Delavaud C, Huszenicza G, Meikle A. 2009. Effect of prepartum energetic supplementation on productive and reproductive characteristics, and metabolic and hormonal profiles in dairy cows under grazing conditions. *Reproduction in Domestic Animals*. 44: 663–671.
21. Cavestany D, Blanc JE, Kulcsar M, Uriarte G, Chilibroste P, Meikle A, Febel H, Ferraris A, Krall E. 2005. Studies of the transition cow under a pasture-based milk production system: metabolic profiles. *Journal of Veterinary Medicine Series. A* 52:1-7.
22. Chamberlin WG, Middleton JR, Spain JN, Johnson GC, Ellersieck MR, Pithua P. 2013. Subclinical hypocalcemia, plasma biochemical parameters, lipid metabolism, postpartum disease, and fertility in postparturient dairy cows. *Journal of dairy science*, 96: 7001-7013.
23. Chew CS, Nakamura K, Ljungström M. 1992. Calcium signaling mechanisms in the gastric parietal cell. *The Yale journal of biology and medicine*, 65: 561.

24. Chilliard Y. 1993. Dietary fat and adipose tissue metabolism in ruminants, pigs, and rodents: A review. *Journal of Dairy Science*. 76: 3897-3931.
25. Chilliard Y. 1999. Metabolic adaptations and nutrient partitioning in the lactating animal. *Biology of Lactation*. 503-552.
26. Chilbroste P, Meikle A, Mattiauda D, Bentancur O, Soca P. 2010. The american Holstein dairy cow during early lactation: grazer or browser. *An Overview of Research and Pastoral-based System in the Southern part of South America* 1: 154-167.
27. Chiodini RJ, Van Kruiningen RS, Merkal. 1984. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): The current status and future prospects. *Cornell Veterinarian*. 74: 218-262.
28. Contreras, PA. 1997. Caracterización y diagnóstico de desbalances nutricionales que limitan la producción en rebaños bovinos de pequeños productores de leche en Valdivia-Chile. *I Encuentro de Facultades Latinoamericanas con Servicios de Asistencia Técnica a Pequeños Productores Rurales*. Salto, Uruguay: 83-104.
29. Convey EM. 1974. Serum hormone concentrations in ruminants during mammary growth, lactogenesis, and lactation: a review. *Journal of Dairy Science*. 57:905.
30. Cook GM, Wells JE, Russell JB. 1994. Ability of *Acidaminococcus fermentans* to oxidize trans-aconitate and decrease the accumulation of tricarballoylate, a toxic end product of ruminal fermentation. *Applied Environmental Microbiology*. 60: 2533-2537.
31. Davis CL, Drackley JK. 1998. Colostrum. The Development, Nutrition, and Management of the Young Calf, 179-206.
32. De Koster JD, Opsomer G. 2013. Insulin resistance in dairy Cows. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 29: 299-322.
33. Delavaud C, Bocquier F, Chilliard Y, Keisler DH, Gertler A, Kann G. 2000. Plasma leptin determination in ruminants: effect of nutritional status and body fatness on

- plasma leptin concentration assessed by a specific RIA in sheep. *Journal of Endocrinology*. 165: 519–526.
34. Del Vecchio RP, DJ Matsas S, Fortin DP, Sponenberg GS Lewis, 1994. Spontaneous uterine infection are associated with elevated prostaglandin F<sub>2α</sub> metabolite concentration in postpartum dairy cows. *Theriogenology*. 41: 413-421.
35. Detilleux, JC, Kehrli Jr ME, Stabel JR, Freeman AE, Kelley DH. 1995. Study of immunological dysfunction in periparturient Holstein cattle selected for high and average milk production. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 44: 251-267.
36. Drackley JK. 1999. Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier?. *Journal of Dairy Science*. 82: 2259-2273.
37. Dominguez JH, Juhaszova M, Feister HA. 1992. The renal sodium-calcium exchanger. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 119: 640-649.
38. Dubois, JM, Rouzaire-Dubois B. 1993. Role of potassium channels in mitogenesis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 59: 1-21.
39. Duffield TF, Lissemore KD, McBride BW, Leslie KE. 2009. Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *Journal of Dairy Science*. 92: 571-580.
40. Ebashi S. 1985. Ca<sup>2+</sup> in biological systems. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 41: 978-981.
41. Elfstrand L, Lindmark-Månsson H, Paulsson M, Nyberg L, Åkesson B. 2002. Immunoglobulins, growth factors and growth hormone in bovine colostrum and the effects of processing. *International Dairy Journal*, 12: 879-887.
42. Favus MJ, Goltzman D. 2009. Regulation of calcium and magnesium. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 104-108.

43. Feher JJ, Wasserman RH. 1979. Intestinal calcium-binding protein and calcium absorption in cortisol-treated chicks: effects of vitamin D3 and 1, 25-dihydroxyvitamin D3. *Endocrinology*, 104: 547-551.
44. Foley JA, Otterby DE. 1978. Availability, storage, treatment, composition, and feeding value of surplus colostrum: a review. *Journal of Dairy Science*. 61:1033–60.
45. Fraser D, Jones G, Kooh SW, Radde IC. 1987. Calcium and phosphate metabolism. *Fundamentals of Clinical Chemistry*. 3: 705-728.
46. Gilbert RO, Shin ST, Guard CL, Erb HN, Frajblat M. 2005. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology*. 64: 1879-1888.
47. Godden S. 2008. Colostrum management for dairy calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 24: 19-39.
48. Goff JP, Horst RL. 1997. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *Journal of Dairy Science*. 80:1260-1268.
49. Goff JP. 2000. Pathophysiology of calcium and phosphorus disorders. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 16: 319-337.
50. Goff JP. 2006. Macromineral physiology and application to the feeding of the dairy cow for prevention of milk fever and other periparturient mineral disorders. *Animal Feed Science and Technology*. 126: 237-257.
51. Gong JG, Lee WJ, Garnsworthy PC, Webb R. 2002. Effect of dietary-induced increases in circulating insulin concentrations during the early postpartum period on reproductive function in dairy cows. *Reproduction-Cambridge*. 123: 419-427.
52. Grafton G, Thwaite L. 2001. Calcium channels in lymphocytes. *Immunology*. 104:119–126.

53. Grummer RR. 1995. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *Journal of Animal Science*. 73: 2820-2833
54. Gruffat D, Durand D, Chilliard Y, Williams P, Bauchart D. 1997. Hepatic gene expression of apolipoprotein B100 during early lactation in underfed, high producing dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 80: 657-666.
55. Grummer RR. 1993. Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 76: 3882-3896.
56. Hanai H, Brennan DP, Cheng L, et al. 1990. Down regulation of parathyroid hormone receptors in renal membranes from aged rats. *American Journal of Physiology*. 259: F444-F450.
57. Hammon DS, Evjen IM, Dhiman TR, Goff JP, Walters JL. 2006. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 113: 21-29.
58. Hancock CR, Han DH, Chen M, Terada S, Yasuda T, Wright DC, Holloszy JO. 2008. High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105: 7815-7820.
59. Hazewinkel HA. 1991. Dietary influences on calcium homeostasis and the skeleton. *Proceedings of the Purina International Nutrition Symposium, Eastern States Veterinary Conference*. 51-59.
60. Herdt TH. 2000. Ruminant adaptation to negative energy balance: Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 16: 215-230.
61. Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ. 2005. Calcium absorption across epithelia. *Physiological reviews*, 85: 373-422.

62. Horst RL, Goff JP, Reinhardt TA. 1990. Advancing age results in reduction of intestinal and bone 1, 25-dihydroxyvitamin D receptor. *Endocrinology*. 126: 1053–1057.
63. Huntington GB. 1990. Energy metabolism in the digestive tract and liver of cattle: influence of physiological state and nutrition. *Reproduction Nutrition Development*. 30: 35-47.
64. Ingvarstsen K, Andersen J. 2000. Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. *Journal of Dairy Science*. 83: 1573–1597.
65. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML (Eds.). 2008. *Clinical biochemistry of domestic animals*. Academic press.
66. Karbach U, Feldmeier H. 1993. The cecum is the site with the highest calcium absorption in rat intestine. *Digestive Diseases and Sciences*. 38:1815-1824.
67. Kehrli ME Jr, Goff JP. 1989. Periparturient hypocalcemia in cows: Effects on peripheral blood neutrophil and lymphocyte function. *Journal of Dairy Science*. 72: 1188–1196.
68. Kobayashi Y, Boyd CK, Bracken CJ, Lamberson WR, Keisler DH, Lucy, MC. 1999. Reduced growth hormone receptor (GHR) messenger ribonucleic acid in liver of periparturient cattle is caused by a specific down-regulation of GHR 1A that is associated with decreased insulin-like growth factor I. *Endocrinology*. 140: 3947-3954.
69. Kimura K, Goff JP, Kehrli ME, Reinhardt TA. 2002. Decreased neutrophil function as a cause of retained placenta in dairy cattle<sup>1</sup>. *Journal of Dairy Science*. 85: 544-550.
70. Kimura K, Reinhardt, TA, Goff, JP. 2006. Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 89: 2588-2595.
71. Kolver ES, Müller LD. 1998. Performance and nutrient intake of high producing Holstein cows consuming pasture or a total mixed ration. *Journal of Dairy Science*. 81:1403-1411.

72. Larsen T, Møller G, Bellio R. 2001. Evaluation of clinical and clinical chemical parameters in periparturient cows. *Journal of Dairy Science*. 84: 1749-1758.
73. Lemann J, Favus MJ. 1999. The intestinal absorption of calcium, magnesium, and phosphate. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Philadelphia, PA, Lippincott, Williams & Wilkins. 63-67.
74. Lewis GS. 2003. Steroidal regulation of uterine resistance to bacterial infection in livestock. *Reproduction Biology and Endocrinology*. 1: 117.
75. Martínez N, Risco CA, Lima FS, Bisinotto, RS, Greco, LF, Ribeiro, ES, Santos JEP. 2012. Evaluation of peripartal calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. *Journal of Dairy Science*. 95: 7158-7172.
76. McDowell LR. 1992. Calcium and Phosphorus. *Minerals in Animal and Human Nutrition*.
77. Meikle A, Kulcsar M, Chilliard Y, Febel H, Delavaud C, Cavestany D, Chilibroste P. 2004. Effects of parity and body condition at parturition on endocrine and reproductive parameters of the cow. *Reproduction*, 127: 727-737.
78. Meikle A, Cavestany D, Ferraris A, Blanc EJ, Elizondo F, Chilibroste P. 2005, XXXIII *Jornadas Uruguayas de Buiatría*. 226-227.
79. Miller RJ. 1992. Voltage-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels. *Journal of Biological Chemistry*. 267: 1403-1406.
80. Moreno L 2017. Importación de leche en polvo se incrementó 55%. Milenio.

81. Nonnecke BJ, Kimura K, Goff JP, Kehrli Jr M E. 2003. Effects of the mammary gland on functional capacities of blood mononuclear leukocyte populations from periparturient cows. *Journal of dairy science*, 86: 2359-2368.
82. Orellana P. 1994. Bases metabólicas para una estrategia alimenticia en rumiantes de alta producción. *Simposio Internacional. Relaciones Endocrinas Durante el Crecimiento y la Reproducción*. 78-87.
83. Ostrum KM, 1990. A review of the hormone prolactin during lactation. *Progress in Food and Nutrition Science*. 14: 1-43.
84. Patschan D, Loddenkemper K, Buttgerit F. 2001. Molecular mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Bone*. 29: 498-505
85. Pereira I, Laborde D, Carriquiry M, López-Villalobos N, Meikle A. 2010. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*. 70: 311-315.
86. Pritchett LC, Gay CC, Besser TE, Hancock DD. 1991. Management and production factors influencing immunoglobulin G1 concentration in colostrum from Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 74: 2336-2341.
87. Partiseti, M, Deist FL, Hivroz C, Fisher A, Korn H, Choquet D. 1994. The calcium current activated by T cell receptor and store depletion in human lymphocytes is absent in a primary immunodeficiency. *Journal of Biological Chemistry*. 269: 32327–32335.
88. Raeymaekers L, Wuytack. Bárány, M. (Eds.). 1996. Calcium Pumps in Biochemistry of smooth muscle contraction. Elsevier. 241 – 253.
89. Rand JS, Kinnaird E, Baglioni A, Blackshaw J, Priest J. 2002. Acute stress hyperglycemia in cats is associated with struggling and increased concentrations of lactate and norepinephrine. *Journal of veterinary internal medicine*, 16: 123-132.

90. Reinhardt TA, Lippolis JD, Mc Cluskey BJ, Goff JP, Horst RL. 2011. Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. *The Veterinary Journal*. 188:122–124.
91. Riccardi D, Brown EM. 2009. Physiology and pathophysiology of the calcium-sensing receptor in the kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 298: F485-F499.
92. Roig, MJ, Alegria A, Barbera R, Farre R, Lagarda MJ. 1999. Calcium bioavailability in human milk, cow milk and infant formulas—comparison between dialysis and solubility methods. *Food Chemistry*. 65: 353-357.
93. Rosol, TJ, Chew, DJ, Nagode, LA, Capen CC. 1995, Pathophysiology of Calcium Metabolism. *Veterinary Clinical Pathology*. 24: 49–63.
94. Rouse D, Suki WN. 1990. Renal control of extracellular calcium. *Kidney International*. 38: 700-708.
95. Rude RK, Kirchen ME, Gruber HE, Stasky AA, Meyer MH. 1998. Magnesium deficiency induces bone loss in the rat. *Mineral and Electrolyte Metabolism*. 24: 314-320.
96. Ruiz Uribe ME. 2015. Inducción a la lactancia en vacas Holstein utilizando un protocolo hormonal prolongado. 2006.
97. Rukkamsuk T, Kruip TAM, Wensing T. 1999. Relationship between overfeeding and overconditioning in the dry period and the problems of high producing dairy cows during the postparturient period. *Veterinary Quarterly*. 21: 71-77.
98. Rutter, B. 2015. Diagnóstico de endometritis subclínica en vacas lecheras. *Maskana*. 6: 131-142.

99. Salgado HEG, Aparicio CA, Velásquez FFH, Castillo MDA, Bouda J. 2014. Effect of the first and second postpartum partial milking on blood serum calcium concentration in dairy cows. *Czech Journal of Animal Science*, 59: 128-133.
100. Schenck PA, Chew DJ. 2008. Calcium: total or ionized? *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 38: 497-502.
101. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación 2017. 5o Informe de Labores 2016 – 2017. Recuperado de <https://www.gob.mx>
102. Silva Colomer JH, Auza NJ, Quiroga MA. 2002. Retención placentaria en la vaca lechera. Su relación con la nutrición y el sistema inmune.
103. Silva JH, Quiroga M, Auza, NJ. 2002. Retención placentaria en la vaca lechera. Su relación con la nutrición y el sistema inmune. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*. 15: 227-240.
104. Secretaría de Economía. 2012. Análisis Del Sector Lácteo en México. Recuperado de [www.economia.gob.mx](http://www.economia.gob.mx)
105. Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S, Gilbert RO. 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology*. 65: 1516-1530.
106. Stockham SL, Scott MA. 2013. *Fundamentals of veterinary clinical pathology*. John Wiley & Sons.
107. Sutton JD, Dhanoa MS, Morant SV, France J, Napper DJ, Schuller E. 2003. Rates of production of acetate, propionate, and butyrate in the rumen of lactating dairy cows given normal and low-roughage diets. *Journal of Dairy Science*. 86: 3620-3633.
108. Szenci O, Chew BP, Bajcsy AC, Szabo P, Brydl E. 1994. Total and ionized calcium in parturient dairy cows and their calves. *Journal of Dairy Science*. 77: 1100-1105.

109. Tamming S, Luteijn PA, Meijer RGM. 1997. Changes in composition and energy content of liveweight loss in dairy cows with time after parturition. *Livestock Production Science*. 52: 31-38.
110. Tucker HA. 1985. Endocrine and neuronal control of the mammary gland. In: Larson BL (Ed.), *Lactation*. The Iowa State University Press, Ames, IA, 39.
111. Tsiligianni TH, Karagiannidis A, Brikas P, Saratsis P. 2001. Physical properties of bovine cervical mucus during normal and induced (progesterone and/or PGF<sub>2</sub>α) estrus. *Theriogenology*. 55: 629-640.
112. Van Mosel, M, Van't Klooster, AT, Van Mosel, F, Van der Kuilen, J. 1993. Effects of reducing dietary [(Na<sup>++</sup> K<sup>+</sup>)-(Cl<sup>-</sup>+ SO<sub>4</sub>=)] on the rate of calcium mobilisation by dairy cows at parturition. *Research in Veterinary Science*. 54: 1-9.
113. Van Werven T, Schukken YH, Lloyd J, Brand A, Heeringa HT, Shea M. 1992. The effects of duration of retained placenta on reproduction, milk production, postpartum disease and culling rate. *Theriogenology*. 37: 1191-1203.
114. Weaver DM, Tyler JW, VanMetre DC, Hostetler DE, Barrington GM. 2000. Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 14: 569-577.
115. Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. 1998. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *The Journal of Clinical Investigation*. 102: 274-282.
116. Winger K, Gay CC, Besser TE, 1995. Immunoglobulin G1 transfer into induced mammary secretions: The effect of dexamethasone. *Journal of Dairy Science*. 78, 1306.

117. Yanagawa N, Lee DBN. 1992. Renal handling of calcium and phosphorus. Coe FL Favus MJ (Eds.) Disorders of bone and mineral metabolism, 3-40.
118. Westgard, JO, Klee GG, Burtis, CA, Ashwood, ER. 1999. Tietz textbook of clinical chemistry. Quality Management: Burtis CA, Ashwood R, editors. 3rd ed. Philadelphia, PA: WB Saunders Co, 384-388.
119. Whitaker DA, Goodger WJ, Garcia M, Perera BMAO, Wittwer F. 1999. Use of metabolic profiles in dairy cattle in tropical and subtropical countries on smallholder dairy farms. *Preventive Veterinary Medicine*. 38 119-131.