



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN Y
SERVICIO EN ZOOTECNIA

POSGRADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

ÁCIDOS GRASOS NO ESTERIFICADOS, CALCIO E INSULINA EN EL
PREPARTO Y SUS RELACIONES CON PRODUCCIÓN DE LECHE DE
VACAS HOLSTEIN-FRIESIAN

TESIS

Que como requisito parcial
para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA



Presenta:

TINAJERO PÉREZ TOMÁS

DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES

Bajo la supervisión de: RUFINO LÓPEZ ORDAZ, Ph.D.



Chapingo, México, junio 2016

**ÁCIDOS GRASOS NO ESTERIFICADOS, CALCIO E INSULINA EN EL
PREPARTO Y SUS RELACIONES CON PRODUCCIÓN DE LECHE DE
VACAS HOLSTEIN-FRIESIAN**

Tesis realizada por Tomás Tinajero Pérez bajo la supervisión del Comité
Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para
obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

DIRECTOR:



Ph. D. Rufino Lopez Ordaz

ASESOR:



Ph. D. Agustín Ruiz Flores

ASESOR:



Dr. Alejandro Lara Bueno

ASESOR:



Ph. D. José Guadalupe García Muñiz

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
DEDICATORIAS.....	ix
AGRADECIMIENTOS.....	x
DATOS BIOGRÁFICOS.....	xi
1 INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
2 REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
2.1 AGNE, insulina, calcio y sus relaciones con producción de leche.....	4
2.3 Metabolitos - fisiología.....	6
2.3.1 Ácidos grasos no esterificados.....	6
2.3.2 Insulina.....	9
2.3.3 Metabolismo del Calcio.....	13
2.4 Literatura citada.....	20
3 Ácidos grasos no esterificados, Calcio e Insulina en el parto y sus relaciones con producción de leche de vacas Holstein-Friesian en confinamiento.....	28
3.1 Resumen.....	28
3.2 Introducción.....	30
3.3 Materiales y métodos.....	32
3.3.1 Localización del área de estudio.....	32
3.3.3 Análisis del suero sanguíneo.....	34
3.3.4 Análisis del alimento.....	34
3.3.5 Análisis estadísticos.....	35
3.4 Resultados.....	38
3.5 Discusión.....	40
3.6 Conclusión.....	47
3.7 Agradecimientos.....	47
3.8 Literatura citada.....	48

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Producción de leche, de ácidos grasos no esterificados (AGNE), Calcio e Insulina de suero sanguíneo obtenidos en diferentes fechas alrededor del parto de vacas Holstein-Friesian en confinamiento.....	51
Cuadro 2. Concentraciones séricas de ácidos grasos no esterificados (AGNE), Calcio e insulina muestreados en diferentes fechas preparto (n = 243) y posparto (n = 250) de vacas Holstein-Friesian de establos comerciales.	52
Cuadro 3. Asociación entre el nivel sanguíneo de AGNE, Calcio e insulina muestreados a los 10 días (n= 243) preparto y 10 y 20 días (n = 251) posparto con producción de leche (kg d ⁻¹) de vacas Holstein-Friesian en tres establos comerciales.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la relación entre el metabolismo de lípidos en tejido adiposo, hígado y ubre. (+) Indica efecto estimulante, (-) indica efecto inhibitorio, (- - -) indica proceso que ocurre en bajas cantidades o sólo durante ciertos estados fisiológicos. NEFA: ácidos grasos no esterificados, Epi: epinefrina, TG: triglicéridos, VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad, CPT-1: carnitin-palmitoiltransferasa-1..... 8

DEDICATORIAS

*Recuerda que cualquier momento es bueno para comenzar
y que ninguno es tan terrible para claudicar.*

*No olvides que la causa de tu presente es tu pasado,
así como la causa de tu futuro será tu presente.*

*Aprende de los audaces, de los fuertes,
de quien no acepta situaciones,
de quien vivirá a pesar de todo.*

*Piensa menos en tus problemas y más en tu trabajo
y tus problemas sin alimentarlos morirán.*

*Aprende a nacer desde el dolor
y a ser más grande que el más grande de los obstáculos...*

Además de este trabajo, quiero dedicar cada uno de mis logros a mi madre, a mi padre y a cada uno de mis hermanos. Mi familia ha sido el aliento para seguir siempre hacia adelante...

Tomás Tinajero Pérez

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Enseñanza Investigación y Servicio en Zootecnia de la Universidad Autónoma Chapingo por haberme formado profesionalmente.

A cada uno de los profesores que a lo largo del tiempo cada consejo, cada enseñanza, forjaron mi carácter. En especial, para los profesores revisores del presente trabajo: Ph. D. Rufino López Ordaz, Ph. D. Agustín Ruíz Flores, Dr. Alejandro Lara Bueno, Ph. D. José Guadalupe García Muñiz.

A Biotecap; Juan de Dios, Vicente, Miguel, Pedro y la bruja que además de haberme apoyado en la fase de campo de la presente investigación, me brindaron su amistad en todo momento.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre: Tomás Tinajero Pérez
Fecha de Nacimiento: 03-Jul-1987
Lugar de Nacimiento: Acámbaro, Gto.
CURP: TIPT870703HGTNRM00
Profesión: Ingeniero Agrónomo Zootecnista
Cédula profesional: 09677274



Desarrollo académico

Bachillerato: Preparatoria Abierta, SEP.
Licenciatura: Ingeniero Agrónomo Zootecnista, UACH
Maestría: Maestría en Ciencias en Innovación Ganadera, UACH

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

El 51% de la producción de leche de México (aproximadamente 5.5 millones de litros) proviene de los sistemas especializados o en confinamiento (SIAP, 2015). En dichos sistemas, la producción de leche (PL) al inicio de la lactancia depende del manejo nutricional durante el periodo seco. Este periodo representa un desafío para los productores lecheros, no solamente por el incremento en la demanda de energía requerida para el crecimiento fetal, sino también por el inicio de la lactancia. Ambos acontecimientos se acentúan debido a la reducción en el consumo de materia seca (CMS) en los primeros días posparto (Grummer, 1995; Drackley, 1999).

Como consecuencia, las vacas experimentan un déficit entre la energía consumida y la requerida y entran en un estado corporal conocido como balance negativo de energía (BEN). Este desbalance puede ser prolongado o corto (Grummer and Rastani, 2004). En ambos casos puede generar pérdidas en PL y conducir a la presencia de cetosis, hipocalcemia o desplazamiento de abomaso (Block, 2010; McArt *et al.*, 2013).

Previos estudios han reportado asociación entre la concentración de ciertos metabolitos sanguíneos durante el periodo de transición con PL. Ospina *et al.* (2010) mencionaron que niveles altos de ácidos grasos no esterificados (AGNE) en el periparto reducen aproximadamente 650 kg el rendimiento de leche (lactancias de 305 días). Por otro lado, LeBlanc (2010) concluyó que altos niveles de AGNE en el día 7-10 previo al parto se asociaron con pérdidas de leche de 1.1 kg d⁻¹ en los primeros 120 días de lactancia (DEL); mientras que Chapinal *et al.* (2012) concluyeron que en vacas multíparas con niveles de AGNE altos y Ca bajos de una semana previa al parto, la PL se redujo aproximadamente 1.6 a 3.2 kg d⁻¹ en los primeros 120 DEL. También se ha reportado que los hatos con concentraciones de AGNE altas mayor a 15-20% al inicio de la lactancia tienden a producir menor cantidad de leche que los animales con concentraciones de AGNE más bajas (McArt *et al.* 2013).

Como se indicó anteriormente, las pérdidas económicas por disminución en volumen de leche cosechado representan sólo la “punta del iceberg”; debido a los problemas periparto generan gastos por medicinas, aumento en mano de obra y en ocasiones desecho prematuro de las vacas (Van Saun, 2015). En dicho contexto, la creación de pruebas rápidas o experimentales que permitan predecir el volumen inicial de leche o evitar la presencia de trastornos metabólicos como hipocalcemia, fiebre de leche o desplazamiento de abomaso mediante un nivel de metabolito alterado se ha vuelto una meta importante.

Con base en lo anterior, los objetivos del presente estudio fueron demostrar la existencia de una asociación entre la concentración sérica de ácidos grasos no esterificados, Ca e insulina previa al parto y la producción de leche inicial en vacas Holstein-Friesian en condiciones de confinamiento.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

El volumen de leche obtenida en el inicio de la lactancia depende del manejo nutricional de la vaca durante el periodo seco. Debido a que en ese tiempo se reúnen el final de la gestación, el parto y el inicio de la lactancia, la vaca presenta alteraciones metabólicas y homeorréticas (Bauman and Currie, 1980). La serie primaria de adaptaciones metabólicas se relaciona con el incremento en la síntesis de glucosa por el hígado y una reducción en la oxidación de la misma por tejidos periféricos (ejemplo: músculos) que participan en el rompimiento de la lactancia. La glucosa representa una demanda esencial durante el periodo de transición debido a los requerimientos de la glándula mamaria para la síntesis de lactosa (Reynolds *et al.*, 2003). Los cambios endocrinos posparto y las alteraciones en respuesta a tejidos dependientes de la insulina por la estimulación de la misma conducen a la distribución de la glucosa para la síntesis de lactosa de la glándula mamaria (Bell, 1995). Debido a los mecanismos de distribución de la glucosa, se presenta una reducción en

la glucosa y un incremento de la lipólisis en el tejido adiposo (Bell and Bauman, 1997).

Una segunda serie de eventos, se relaciona con la movilización de reservas corporales, particularmente, las reservas de grasa, en apoyo al incremento de la demanda energética al inicio de la lactancia, que es paralela al consumo insuficiente de energía. Esta movilización de grasa corporal ocurre a través de la liberación de los AGNE a la circulación sanguínea (Reynolds *et al.*, 2003). Estos son usados como energía en los tejidos corporales y como precursores de la síntesis de grasa. Desafortunadamente, en el periodo preparto, el hígado tiene capacidades limitadas para usar todos los AGNE que se producen y se transforman en triglicéridos. Los triglicéridos inician con daños al hígado, reducen la capacidad de generación de urea y gluconeogénesis (Adewuyi *et al.*, 2005).

Otros eventos se relacionan con la movilización de reservas proteínicas donde el músculo juega un rol importante para suplir el combustible mediante gluconeogénesis que se requiere debido al BNE. En este caso, el hígado suele servir como regulador clave para proveer glucosa a los tejidos y la sangre; esencialmente, el hígado es el lugar donde se lleva a cabo la gluconeogénesis aunque el riñón contribuye con una pequeña cantidad; que para enfrentar estos cambios incrementa la absorción y la movilización de Ca (Herdt, 2000).

Los cambios homeorréticos que ocurren en la vaca durante el periodo de transición fueron descritos por Bauman y Currie (1980); mientras que los cambios metabólicos en el hígado fueron reportados por Overton (2004). El metabolismo de lípidos fue reportado por Contreras y Sordillo (2011), mientras la liberación y absorción de los AGNE fue descrita por Reynolds *et al.* (2003). La relación entre la gluconeogénesis y metabolismo de los AGNE fue descrita por Overton and Drackley, (1999); mientras que los requerimientos del feto, conceptus y síntesis de leche fueron abordados por Block (2010).

Con base en lo anterior, la presente revisión se enfocará en los efectos de los metabolitos sanguíneos como AGNE y Ca, y las hormonas como insulina en el metabolismo de los nutrientes durante el periodo seco y su relación con PL en la lactancia inmediata.

2.1 AGNE, insulina, calcio y sus relaciones con producción de leche

Algunos estudios publicados antes que el presente, sugirieron que los niveles circulantes en la sangre de AGNE, Ca e insulina durante el final de la gestación, pueden relacionarse con la PL inicial. McGuire *et al.* (1995) indicaron que los niveles séricos de insulina no tienen un efecto galactopoyético directo. Sin embargo, la infusión de insulina (un día previo al parto) mejoró la producción de proteína de la leche. También se observó una reducción en el CMS del 29%, sin efectos directos en el volumen de leche producido, debido a que la movilización de reservas corporales abasteció los nutrientes requeridos.

Ingvartsen y Friggens, (2005) concluyeron que insulina y glucosa fueron los predictores individuales más efectivos para explicar la variabilidad entre la concentración preparto de hormonas y metabolitos con la respuesta en PL en la tercera lactancia. El estudio incluyó insulina sérica, hormona del crecimiento, hormonas de la tiroides, AGNE, glucosa, β -hidroxibutirato y N ureico.

En otro estudio, Carson (2009) observó que los niveles séricos de AGNE ≥ 0.5 mEq L⁻¹, en las últimas semanas de gestación, se asociaron con pérdidas de 1.10 kg animal d⁻¹ de leche en los primeros 120 de lactancia. Por su parte, Ospina *et al.* (2010) indicaron que cuando las concentraciones de AGNE preparto (14 a 2 días) fueron ≥ 0.33 mEq/L, la PL disminuyó en aproximadamente 683.00 kg por lactancia. También se observó una reducción de aproximadamente 647.00 kg de leche cuando las concentraciones postparto (3 a 14 días) fueron de ≥ 0.72 mEq/L. Los mismos autores concluyeron que los incrementos pre y postparto de las concentraciones séricas de AGNE tuvieron efectos negativos en la PL.

Otros estudios de asociación de metabolitos con PL al inicio de la lactancia fueron reportados por Chapinal *et al.* (2012), quienes observaron que niveles séricos $\geq 0.5 \text{ mEq L}^{-1}$ de AGNE y $\leq 2.1 \text{ mmol L}^{-1}$ de Ca en la semana previa al parto se asociaron con pérdidas de 1.6 a 3.2 kg leche animal d^{-1} durante los primeros 120 DEL, mientras que niveles altos (≥ 0.7 y $\geq 1.0 \text{ mEq L}^{-1}$) de AGNE en la semana uno y dos post parto y bajos niveles de Ca ($\leq 2.1 \text{ mmol L}^{-1}$) se asociaron con una pérdida en PL de 1.8 a 7.1 kg d^{-1} en los primeros 30 DEL. Los autores concluyeron que concentraciones de AGNE altas y concentraciones bajas de Ca alrededor del parto fueron asociadas con PL bajas.

De acuerdo con la literatura revisada, el parto es una etapa crucial en el comportamiento productivo de la vaca lechera al inicio de la lactancia, y debe impactar las actividades esenciales del animal durante la lactancia completa. Lo que sugiere que se debe cambiar el paradigma de que la “vaca seca” no produce y deberá estar presente la idea de que la lactancia inicia a la par con el periodo seco y no al momento del parto. Algunos reportes indicaron que existe relación entre las concentraciones de metabolitos sanguíneos como AGNE, Ca e insulina con producción de leche al inicio de la lactancia inmediata. Lo que sugiere la existencia de una herramienta valiosa para el manejo práctico de los animales durante el periodo seco, previniendo la presencia de trastornos metabólicos con el volumen inicial de leche en las explotaciones con animales Holstein-Friesian. En las páginas siguientes, se hace una relación de las posibles rutas metabólicas que se siguen con los metabolitos en forma individual.

2.3 Metabolitos - fisiología

2.3.1 Ácidos grasos no esterificados

Los ácidos grasos no esterificados (AGNE) también son llamados ácidos grasos libres o insaturados y son los componentes principales de los triglicéridos (reservas de grasa en el cuerpo), los cuales se forman a partir de tres ácidos grasos unidos a un esqueleto de glicerol (Eclinpath, 2015). La difusión de estos AGNE en la sangre provee energía a los tejidos corporales, sin embargo, en exceso pueden ser tóxicos. La capacidad del hígado de la vaca para metabolizar AGNE en triglicéridos es limitada, por lo que pueden ser oxidados o exportados como lipoproteínas de muy baja densidad. Cuando se alcanza el límite, los triglicéridos se acumulan en hígado y la acetil Co-A (resultante de la oxidación de ácidos grasos) que no es utilizada en ciclo del ácido tricarboxílico es convertida en cuerpo cetónicos (acetona, acetoacetato y beta-hidroxibutirato) los cuales pueden aparecer en sangre, leche y orina (Adewuyi *et al.*, 2005).

Cuando existe un BNE se presenta la hidrólisis de triglicéridos mediante lipasas (localizadas dentro de los adipocitos) sensibles a hormonas (glucagón y corticoesteroides por ejemplo). Por lo tanto, los AGNE pueden ser utilizados como una fuente de energía por varios tejidos, incluyendo músculo esquelético y hepatocitos (Eclinpath, 2015).

Cuando el alimento es abundante los rumiantes conciben y almacenan el exceso de nutrientes como reservas corporales en tejido adiposo, dichas reservas se movilizan en tiempos de escasez o en ciertos estados fisiológicos. Por ejemplo, en el periodo de transición las concentraciones sanguíneas de AGNE incrementan unos pocos días previos al parto y llegan a niveles máximos durante el parto y hasta dos semanas post parto (Adewuyi *et al.*, 2005). Estos cambios son parte de las adaptaciones metabólicas por un incremento tanto en la movilización de AGNE del tejido adiposo como su utilización por los tejidos periféricos (Stanley, 2005). Conjuntamente con un CMS deficiente, las

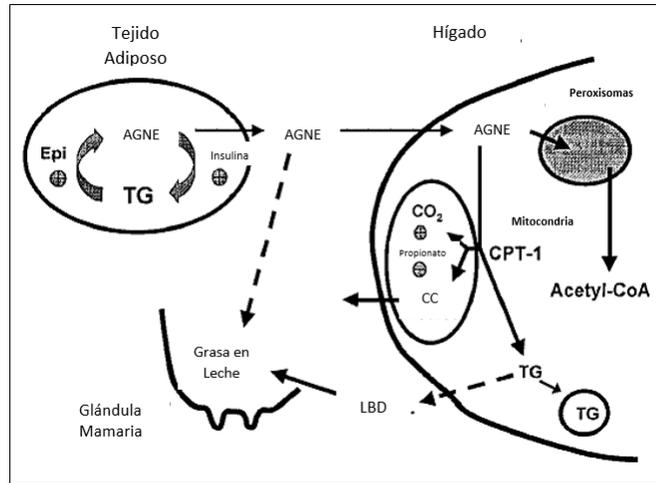
concentraciones de AGNE en plasma aumentan como respuesta al incremento de las necesidades de energía, por lo tanto, existe una relación inversa entre CMS y concentraciones de AGNE en plasma (Overton and Waldron, 2004). Sin embargo, si hay un exceso en la difusión de AGNE en sangre puede resultar un cuadro tóxico (Adewuyi *et al.*, 2005). Por otra parte, los AGNE también son utilizados para formar más del 40% de la grasa de la leche en los primeros días de la lactancia (Bell, 1995).

De acuerdo a Drackley (2000), los niveles normales de AGNE para una vaca en balance de energía positivo son < 0.2 mM, durante el final del periodo seco, aunque estos niveles se incrementan lentamente y alcanzan valores medios entre 0.5 y 1.0 mM en la última semana antes del parto. También se observó, que en general, alcanzan el pico (0.8-1.2 mM) el día del parto debido a los cambios hormonales y al estrés provocado por el mismo evento. Después del parto, los niveles bajan o si por el contrario son > 0.7 mM indican un BNE severo, luego por seis semanas después del parto los valores son nuevamente < 0.3 mM, como una confirmación de que el BNE ha desaparecido.

Cuando la oxidación de los AGNE es completa se generan metabolitos como acetil-CoA, que puede ser utilizado para producir energía vía ciclo de Krebs, si la oxidación es incompleta se producen cuerpos cetónicos, principalmente, β -hidroxibutirato y acetoacetato como una estrategia adicional para compensar la ingesta insuficiente de precursores de glucosa. En presencia de niveles bajos de insulina y niveles altos de glucagón/adrenalina se mejora la oxidación de AGNE, por la disminución de las concentraciones de malonil-CoA (precursor de la síntesis de grasa) y sensibilidad de la carnitina-palmitoiltransferasa-1 a metilmalonil-CoA (Adewuyi *et al.*, 2005).

La carnitina-palmitoiltransferasa-1 es responsable de la translocación de AGNE del citosol a la mitocondria para la oxidación y es inhibida por malonil-CoA. Esta última, es responsable de los cambios en insulina y glucagón/adrenalina en rumiantes, incrementando cuando la insulina aumenta y viceversa (Adewuyi *et al.*, 2005). La relación que se desarrolla entre tejido adiposo, hígado y ubre se

muestra en la Figura 1, donde la captación de AGNE en la mitocondria es regulada por la actividad de la carnitina-palmitoiltransferasa-1 (Drackley, 1999).



Fuente: Drackley, 1999.

Figura 1. Representación esquemática de la relación entre el metabolismo de lípidos en tejido adiposo, hígado y ubre. (+) Indica efecto estimulante, (-) indica efecto inhibitorio, (- -) indica proceso que ocurre en bajas cantidades o sólo durante ciertos estados fisiológicos. AGNE: ácidos grasos no esterificados, Epi: epinefrina, TG: triglicéridos, LBD: lipoproteínas de baja densidad, CPT-1: carnitina-palmitoiltransferasa-1.

La lactogénesis, por lo tanto, es acompañada por un incremento en la lipólisis y una disminución en lipogénesis en tejido adiposo (Stanley, 2005). La captación de AGNE por la glándula mamaria depende de las concentraciones circulantes y es importante saber que los ácidos grasos en leche surgen de dos fuentes; de la captación en dicha circulación y de la síntesis (*de novo*) dentro de las células epiteliales de la glándula mamaria. Los AGNE son utilizados y forman parte de aproximadamente el 40% de la grasa de la leche durante los primeros días de lactancia (Bell, 1995).

2.3.2 Insulina

La hormona insulina se produce en las células β de los islotes Langerhans del páncreas. La liberación de insulina se estimula por glucosa, aminoácidos (AA) y algunas hormonas reguladoras (glucagón, GH, epinefrina), mientras que la liberación se inhibe por hipoglucemia, o por la presencia de somatostatina y norepinefrina (Ecllinpath, 2015).

La insulina participa en varios procesos metabólicos y la mayoría de sus efectos son conocidos completamente en la actualidad. Sin embargo, todavía permanece sin clarificarse las rutas metabólicas mediante las cuales la insulina controla la concentración de glucosa en la sangre. De hecho, es posible cuestionar la idea aceptada de que los cambios en la concentración de insulina en plasma, están directamente involucrados con el control de glucosa en sangre, y que esto último es, fisiológicamente, sólo un papel menor de la hormona con relación a sus efectos promedio en el metabolismo general de animales y humanos. Actualmente, las acciones de insulina en el metabolismo de carbohidratos incluyen el incremento en la tasa de transporte de glucosa a través de las membranas celulares en músculo y tejido adiposo; en los mismos tejidos incrementa la tasa de glucolisis y estimula la actividad de las enzimas hexoquinasa y 6-fosfructoquinasa (Dimitriadis *et al.*, 1997). También estimula la tasa de síntesis de glucógeno (Rossetti *et al.*, 1990) en muchos tejidos incluyendo el hígado e inhibe glucogenólisis y gluconeogénesis (Dimitriadis *et al.*, 1988).

Otras de las acciones conocidas de la insulina incluyen su participación en el metabolismo de lípidos. En dicho metabolismo no sólo participa en la reducción de la lipolisis en el tejido adiposo, sino también estimula la reducción de ácidos grasos y la síntesis de triglicéridos. Las acciones incluyen incrementos en la tasa de formación de lipoproteínas de muy baja densidad en el hígado, consumo de triglicéridos de la sangre y la reducción en la tasa de oxidación de

ácidos grasos en el músculo e hígado. Finalmente, También participa en la síntesis de colesterol a nivel hepático (Bauman and Elliot, 1983).

En los últimos años, se ha enfatizado que el tejido adiposo tiene un papel más allá del simple almacén de exceso de energía (los adipocitos secretan un número grande de hormonas y citoquinas) que pueden afectar la homeóstasis energética y la sensibilidad de los tejidos a la insulina (Frayan, 2002). El almacenamiento y movilización de grasas por si mismos son regulados en forma precisa y cuidadosa, con un control minuto a minuto y un incremento rápido en el flujo metabólico. Por ejemplo, durante la transición del ayuno al periodo postprandial (Dyck, 2009). El tejido adiposo funciona como un buffer del nivel y flujo de ácidos grasos en la circulación en el periodo postprandial, y se ha considerado análogo en la capacidad buffer del flujo de glucosa al hígado y músculo en el mismo periodo (Fryan, 2002). El tejido adiposo actúa como buffer en la regulación de la liberación de AGNE en la circulación de acuerdo a las condiciones de alimentación o ayuno a través de los cambios en la actividad de enzimas sensitivas como lipasas. El tejido adiposo tiene una acción primaria vía el efecto de la insulina (Dimitriadis *et al.*, 2006).

Los efectos de la insulina en el metabolismo de proteínas incluyen el incremento en la tasa de transporte de aminoácidos, síntesis de proteínas en músculo, tejido adiposo, hígado y otros. También reduce la degradación de proteínas en músculo y la formación de urea. La concentración normal de proteínas se mantiene como un balance de la síntesis y degradación. En el músculo, se sabe que la insulina afecta estos procesos en direcciones opuestas, incrementando la síntesis y reduciendo la degradación para favorecer un proceso anabólico (Liu *et al.*, 2002).

El efecto promedio es la reducción de la liberación de AA del músculo e incrementa su incorporación en proteínas. Sin embargo, para mantener las condiciones anabólicas corporales, es importante mantener las concentraciones de AA normales en el plasma. La provisión de AA de una comida mezclada debería asegurar esto, sin embargo, en una dieta baja en proteínas y alta en

carbohidratos, los efectos de la insulina sobre la liberación de AA deberían resultar en concentraciones bajas de AA en el plasma. Sin embargo, la inhibición de gluconeogénesis por insulina debería decrecer la utilización de AA en el hígado y por lo tanto, prevenir su reducción en plasma (Newsholme and Leech, 1983; Dimitriadis and Newsholme, 2004).

La insulina estimula el transporte de glucosa y glucólisis en músculo y tejido adiposo, y no produce el mismo efecto en hígado y otras células, debido a un principio de control lógico del metabolismo. Sin embargo, el transporte de la glucosa es un paso importante en el metabolismo de la célula debido a que controla la tasa de utilización de la misma. En el músculo esquelético y el tejido adiposo hay varios transportadores incluyendo GLUT1, GLUT2, GLUT3 y GLUT4. La acción de insulina incrementa la tasa de consumo de glucosa mediante la estimulación de transportadores GLUT4 de las reservas intracelulares a la superficie de las membranas (Sheppard and Kahn, 1999).

La insulina afecta el endotelio vascular e incrementa el flujo sanguíneo en tejido adiposo y músculo por el incremento en la vasodilatación y el reclutamiento capilar. Los efectos de la insulina en el flujo del torrente sanguíneo son mediados por un incremento del ácido nítrico (NO) derivado del endotelio. Invariablemente, la exposición de células endoteliales a incrementos en las concentraciones de AGNE daña la función endotelial y la producción no mediada por la presencia de insulina, lo que conduce a la reducción de la producción que si es mediada por insulina (Steinberg *et al.*, 2000).

La habilidad de la glucosa sanguínea a los cambios en respuesta a los niveles de insulina es el daño a un número relativamente grande de condiciones comunes (diabetes, edad, obesidad y varias endocrinopatías). Esto se conoce como intolerancia a la glucosa, una condición que puede ser causada por la resistencia de los tejidos a los efectos de la insulina. La frecuencia con la cual estos estados de intolerancia pueden ocurrir y la severidad de los síntomas que pueden desarrollarse a partir de ellos, le ha dado un interés médico especial a la resistencia como una patología (Moller y Flier, 1991). Por supuesto, en

algunas condiciones, la sensibilidad a la insulina incrementa y puede ser importante al aumentar el metabolismo de la glucosa con sólo pequeños incrementos de insulina en plasma.

De forma que, si ocurre un incremento en la sensibilidad de insulina en uno o más músculos esqueléticos, el incremento de entrada de glucosa en el cuerpo después de una comida, debería ser seguido de la ausencia de un marcado (o sin un) cambio en la concentración sanguínea de insulina. El nivel de glucosa debería ser controlado por cambios en la sensibilidad de insulina a nivel de tejido más que por un cambio de la secreción de insulina del páncreas o por la concentración de la misma en el plasma. En este caso, la presencia de insulina más que cualquier cambio en su concentración, es necesaria para la regulación de la concentración de glucosa en sangre. Esta sugerencia es apoyada por experimentos con sujetos normales y diabéticos tipo-1 que fueron ejercitados en una bicicleta por dos horas. Los últimos fueron privados de insulina por 12 h, de tal forma que tuvieran niveles de insulina bajos circulando en la sangre. A pesar de esto, el consumo de glucosa y la síntesis de glucógeno en el músculo fueron similares en ambos grupos después de la descarga de glucosa (Maehlum *et al.*, 1977). Similares resultados fueron reportados cuando se usa ^{13}C -NMR a la tasa continua de la síntesis de glucógeno en el músculo. El mecanismo preciso mediante el cual, el ejercicio resulta ser efectivo es obviamente dependiente del incremento en la sensibilidad de insulina (Price *et al.*, 2000).

El éxito de la insulina en reducir la concentración de la glucosa sanguínea en los primeros estudios en animales diabéticos, engrandece la importancia del papel de la hormona para facilitar la utilización de glucosa. En 1950, cuando se descubrió que insulina incrementaba la tasa de transporte de glucosa en células musculares, obviamente, se creyó que éste efecto fue el significado principal mediante el que insulina, regulaba la concentración de glucosa en sangre *in vivo*. La aparición del ciclo regulatorio glucosa-ácidos grasos en 1960, permitió una interpretación diferente del significado por el cual insulina regula la concentración de glucosa en sangre. Debido a que la insulina es una hormona

anti-lipolítica potente, el incremento en la concentración debería reducir la tasa de lipólisis en el tejido adiposo, que como consecuencia reduciría la concentración de AGNE del torrente sanguíneo, que a su vez, debería incrementar la tasa de la utilización de glucosa en el músculo. En adición a dichos efectos, la reducción de ácidos grasos por insulina debería facilitar la reducción de la glucosa endógena.

En el estado postprandial, estos efectos ayudarían a incorporar los ácidos grasos de las comidas en triglicéridos en el tejido adiposo. En contraste, en el estado postabsortivo, la reducción en los niveles sanguíneos de glucosa por efecto de la insulina incrementaría las concentraciones de AGNE en sangre; lo que contribuye a un incremento en las tasas de gluconeogénesis y el mantenimiento de la glucosa dentro de los rangos normales. Los cambios en las concentraciones de los compuestos que precisamente modifican la sensibilidad de la insulina y el tejido adiposo (como IGF-1 o el nivel de glucógeno), pudieran ser importantes en el control de la utilización de glucosa. Estos efectos de la insulina deberían facilitarse por un incremento en el flujo sanguíneo en el músculo y tejido adiposo, cuando las concentraciones de insulina incrementan, particularmente, en periodos seguidos por comidas.

2.3.3 Metabolismo del Calcio

Los retos más recurrentes en la producción lechera son los relacionados con la salud y la productividad de la vaca en el inicio de la lactancia. Por varias razones, unas conocidas y otras desconocidas, el nivel sérico de Ca^{2+} tiene un papel fundamental en la PL. El Ca^{2+} es constituyente de muchos procesos fisiológicos esenciales desde señales extracelulares hasta la mineralización de hueso (Alexander *et al.*, 2014). Actualmente, se sabe que Ca^{2+} está involucrado en la transmisión de impulsos nerviosos, contracción de músculos, coagulación de la sangre, actividad secretora de las células, diferenciación celular, respuesta inmune y activación enzimática (Mori *et al.*, 2014). En condiciones normales de producción y edad de las vacas, una alteración en el nivel

sanguíneo de Ca^{2+} , activa los mecanismos homeostáticos del mantenimiento del balance del Ca^{2+} . Dichos mecanismos incluyen un incremento en la absorción intestinal, reabsorción en huesos, y reducción de la excreción renal de Ca^{2+} . En estos procesos participan dos hormonas: 1, 25, dihidroxivitamina D y la paratiroides (Goff *et al.*, 1991). La desregulación del Ca^{2+} es asociado con desórdenes en los huesos, enfermedades metabólicas (Bartlett *et al.*, 2014) y un incremento del riesgo de cáncer epitelial intestinal (Teixeira *et al.*, 2014).

El intestino, riñón, huesos y glándula paratiroidea trabajan juntos para mantener los niveles séricos de Ca^{2+} dentro de un balance preciso. La absorción intestinal del Ca^{2+} es un proceso crucial para el mantenimiento del balance de Ca^{2+} y la salud de los huesos. Esto ocurre mediante dos mecanismos principales: un transporte transcelular manejado mecánicamente y una ruta pasiva no saturable llamada la ruta paracelular (Perez *et al.*, 2008). Ambas rutas son reguladas por hormonas, nutrientes y otros factores. Muchos trabajos de investigación se han realizado para cerciorarse de los mecanismos de regulación de estos factores debido a su relevancia en la prevención de enfermedades como osteoporosis en humanos y fiebre de leche, desplazamiento de abomaso y cetosis entre otras, en animales lecheros.

La ruta transcelular implica el movimiento del Ca^{2+} del lado mucoso al seroso de las barreras intestinales que se dan en contra de gradientes de concentración. Dicha ruta es un proceso activo saturable que predomina en el duodeno y yeyuno; y que es regulado por factores físicos y nutricionales, principalmente, la vitamina D. La ruta transcelular de la absorción intestinal de Ca se concentra en tres pasos: 1) la entrada del Ca^{2+} a través de la membrana epitelial en los canales epiteliales de Ca^{2+} , 2) el movimiento del Ca^{2+} a través de las membranas epiteliales de la membrana basolateral por la unión de proteínas con alta afinidad para el Ca^{2+} (calbindinas) y 3) el Ca^{2+} se extrae vía la membrana plasmática de Ca-ATPasa (PMCA1b/ Ca^{2+}) y el intercambio Na/ Ca^{2+} (Perez *et al.*, 2008).

Dos canales epiteliales de Ca están involucrados con la entrada de Ca^{2+} al enterocito: el canal epitelial transitorio receptor potencial vaniloide 6 (TRPV6, previamente llamado EcaC2 y CaT1) y TRPV5 (previamente llamado EcaC1 y CaT2). Ambos canales son co-expresados en el riñón de humanos e intestinos, excepto TRPV6 que es altamente expresado en intestinos y el TRPV5 es la isoforma especial. Por el contrario, se han detectado niveles altos de TRPV6 en el duodeno y colón de humanos, ratas y ratones (Nijenhuis *et al.*, 2003). TRPV5 y TRPV6 también están presentes en otros órganos como el páncreas, próstata, las glándulas mamarias, sudoríparas y salivales (Susuki *et al.*, 2008).

Tradicionalmente, las calbindinas fueron consideradas para llevar el Ca^{2+} del lado apical del enterocito hasta la membrana basolateral de la célula. Las calbindinas no solamente transportan el Ca^{2+} , sino que también mantienen la capacidad buffer de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} por debajo de $7-10 \text{ mol L}^{-1}$, y previene la muerte celular prematura por apoptosis. El exceso de Ca^{2+} resulta de la desregulación de calbindinas que puede desencadenar apoptosis en las células epiteliales (Choi *et al.*, 2011). También es conocido que una concentración alta de Ca^{2+} libre provoque apoptosis en diferentes tipos de células. Por otro lado es posible que las calbindinas inhiban la apoptosis en los osteoblastos (Bellido, 2000) y en las células germinales de ratones (Merino *et al.*, 2008).

El movimiento de las moléculas y iones a través de la ruta paracelular es regulada por las uniones entre membranas, los cuales son dominios especializados, principalmente, posicionados en la región apical de los enterocitos. Las uniones entre membranas son estructuras celulares donde las membranas plasmáticas de células adyacentes tienen un contacto cercano. Dichas uniones están compuestas de proteínas que está detrás de las membranas, componentes del citoesqueleto y placas citoplasmáticas (Gumbier, 1996).

Las proteínas detrás de las membranas de las uniones son sintetizadas en células adyacentes incluyendo ocludinas y claudinas, estas proteínas cierran los espacios intracelulares de las uniones y restringen el movimiento de materiales a través de los espacios paracelulares. Las ocludinas 2, 12, y 15 son responsables por el transporte del Ca^{2+} en el intestino. Claudina 1 y 5 tienen funciones claras que deberían afectar el transporte del Ca^{2+} , como ellos influyen en la permeabilidad paracelular (Inai *et al.*, 1999). El involucramiento de las ocludinas en la absorción del Ca^{2+} intestinal permanece sin ser determinado. Las ocludinas son proteínas transmembranas, sin embargo, su función precisa no está bien establecida (Hwang *et al.*, 2013).

El transporte de Ca^{2+} a través de las membranas es un proceso pasivo que depende de la concentración y el gradiente eléctrico a través del epitelio. El proceso es un transporte no saturable que predomina en el yeyuno y el íleon cuando el consumo del Ca es inadecuado o alto. La ruta es importante cuando el consumo del Ca^{2+} es alto, debido a que el tiempo de residencia en el intestino es corto y hay una desregulación de proteínas involucradas en la ruta transcelular (Brooner, 2003).

1, 25- $(\text{OH})_2 \text{D}_3$ es la hormona principal en el control de la absorción del Ca. Lo que causa cambios en la estructura y función de los enterocitos (Alisio *et al.*, 1997), los cuales aumentan el transporte del Ca en el intestino. La acción de calcitriol es mediada por mecanismos genómicos y no genómicos después de la unión a VDR. Este receptor, localizado fundamentalmente en el núcleo, es un factor de transcripción que medía los efectos celulares de la vitamina D por la unión de los elementos de respuesta de los genes objetivos. Más allá de la función intestinal en la absorción del Ca, un enfoque proteómico reciente ha revelado que VDR es también un factor importante en controlar la proliferación de células, la migración y las respuestas al estrés en el intestino delgado (Kühne *et al.*, 2014).

La ruta paracelular de la absorción de Ca^{2+} intestinal se incrementa con la presencia de $1, 25 (\text{OH})_2 \text{D}_3$, predominantemente en el yeyuno e íleon (Cross *et al.*, 2011). Se ha encontrado que $1, 25 (\text{OH})_2 \text{D}_3$ significativamente aumenta los niveles de claudinas-2 y 12 mRNA en las células del cáncer de colon Caco-2. Recientemente, se han encontrado evidencias de la regulación de la absorción del Ca^{2+} por otras hormonas.

La hormona paratiroidea actúa indirectamente en la absorción del Ca^{2+} intestinal por estimulación renal del CYP27B1 y por lo tanto, incrementa $1, 25 (\text{OH})_2 \text{D}_3$ que es dependiente de la absorción del Ca^{2+} . Un efecto directo de la hormona paratiroidea no ha sido demostrado, excepto que algunos efectos directos del consumo de Ca^{2+} por los enterocitos por efectos de la paratiroidea fueron reportados en el duodeno de ratas. Con respecto a la tiroides se ha reportado que ellos producen un efecto cooperativo entre la vitamina D y el transporte de Ca^{2+} intestinal.

Aparentemente, las hormonas de la tiroides incrementa la acción genómica de $1, 25 (\text{OH})_2 \text{D}_3$ en el intestino (Cross *et al.*, 1990); mientras que la GH tiene un papel principal en el crecimiento lineal y la deposición del Ca en los huesos durante la niñez y la adolescencia. La GH tiene un efecto proliferativo en el epitelio intestinal (Shulman, 2000), y también estimula la absorción del Ca^{2+} intestinal, el cual puede ocurrir directamente por el incremento en el suero de la concentración de $1, 25 (\text{OH})_2 \text{D}_3$ (Zoidis *et al.*, 2002). Sin embargo, también se ha demostrado que los tratamientos con GH incrementa la absorción intestinal de Ca^{2+} en ratas adultas sin incrementar los niveles séricos de $1, 25 (\text{OH})_2 \text{D}_3$. En humanos adultos la absorción del Ca^{2+} ha demostrado estar positivamente correlacionado con IGF-1 y las reducciones de IGF-1 relacionadas con la edad tienen un efecto negativo en la absorción del Ca^{2+} que deberían no ser explicados por la reducción sérica de $1, 25 (\text{OH})_2 \text{D}_3$.

La absorción intestinal del Ca^{2+} cambia de acuerdo a las condiciones fisiológicas de los individuos. Cuando las necesidades son altas y el Ca^{2+} dietético es bajo, la absorción de Ca intestinal es más eficiente. El crecimiento, preñez, lactancia y deficiencia del Ca^{2+} de la dieta y la alta actividad física aumenta la demanda por el Ca^{2+} que promueve la absorción intestinal. Durante la preñez, la absorción del Ca^{2+} es más alta antes de la concepción o después del parto. Los aumentos ocurren de la preñez temprana a la mitad, y precede la demanda por los requerimientos del feto para crecimiento del esqueleto. Esta alteración de la absorción del Ca^{2+} durante la preñez puede ser debido a un incremento del calcitrol sérico, con poca alteración de la hormona paratiroidea o calcitonina (Prentice, 2000).

La reabsorción del Ca^{2+} en el hueso es estimulada por DHDV. Cuando el hueso es reabsorbido y la matriz desmineralizada por H^+ y Cl^- proveniente de los osteoclastos y los minerales del hueso Ca^{2+} y P son liberados. Calcio y P están íntimamente relacionados en los minerales del hueso en la forma de fosfato de Ca^{2+} , el cual es amórfico, o como hidroxapatita de P. Los huesos contienen dos tipos de células primarias: osteoblastos que sintetizan y depositan hueso y osteoclastos que lo reabsorben. Los osteoblastos controlan la diferenciación de los osteoclastos y sirven como mediadores de su actividad. La movilización de los huesos resulta en iones de Ca^{2+} y P que están siendo liberados en la circulación (Goff, 2000). La movilización es manejada primariamente por la concentración del Ca^{2+} sanguíneo más que por el P. Los niveles bajos de Ca^{2+} promueven síntesis de DHVD, lo cual activa a los osteoblastos para incrementar el número de osteoclastos, los cuales a su vez incrementaran la reabsorción del hueso e incrementan los niveles sanguíneos de Ca^{2+} y P.

El receptor proteínico para DHVD se expresa en los huesos, solamente en los osteoblastos; la acción de los osteoclastos es estimulada indirectamente (Horst *et al.*, 1994). La expresión del receptor activador de NF- κ B ligand (RANKL) es promovida cuando DHVD se une al receptor en osteoblastos (Teitelbaum, 2000). La presencia de RANKL promueve la diferenciación de los macrófagos

en osteoclastos vía osteoclastogénesis, como consecuencia incrementa el número de osteoclastos y finalmente incrementa la reabsorción del hueso.

La entrada difusional Ca^{2+} desde el lumen en la célula también se incrementa por la PTH. La hormona paratiroidea inicia una carga negativa intracelular más alto mediante el aumento de la conductancia de iones cloruro de la membrana basolateral que promueve la difusión de los iones Ca^{2+} carga positiva a través de la membrana celular. Si la concentración de Ca^{2+} en la sangre es ligeramente más bajo, entonces estas acciones en el riñón pueden llevar la concentración de Ca^{2+} de nuevo a un rango aceptable en el animal. Este mecanismo no puede resolver la hipocalcemia significativa, sin embargo, debido a que la cantidad total de Ca^{2+} que puede ser recuperado de la orina es relativamente pequeño en la vaca lechera (Goff, 2000). La calcitonina tiene actividad inversa de PTH y se libera en un estado de hipercalcemia. En presencia de calcitonina intestinal, se da una disminución de absorción de Ca^{2+} y de osteoclastos, con ello se produce un aumento en la formación de los huesos.

2.4 Literatura citada

- Adewuyi, A. A., E. Gruysi and F. J. C. M. Van Eerdenburg. 2005. Non-esterified fatty acids (NEFA) in dairy cattle. A review. *Veterinary Quarterly* 27(3): 117-126.
- Alexander, R. T., B. R. Hemmelgarn, N. Wiebe, A. Bello, S. Samuel, S. W. Klarenbach, G. C. Curhan, and T. Tonelli. 2014. Kidney stones and cardiovascular events: a cohort study. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 9: 506-512.
- Alisio, A., F. Cañas, D. H. DeBronia, R. Pereira, and N. T. DeTalamoni. 1997. Effect of vitamin D deficiency on lipid composition and calcium transport in basolateral membrane vesicles from chick intestine. *IUBMB Life* 42: 339-347.
- Aschenbach, J. R., N. B. Kristensen, S. S. Donkin, H. M. Hammon, and G. B. Penner. 2010. Gluconeogenesis in dairy cows: the secret of making sweet milk from sour dough. *IUBMB Life* 62(12): 869-877.
- Bartlett, J. D., G. L. Close, B. Drust, and J. P. Morton. 2014. The emerging role of p53 in exercise metabolism. *Sports Medicine* 44: 303-309.
- Bauman, D. E. and J. M. Elliot. 1983. *Biochemistry of Lactation*. Mephram, T. B., ed. pp. 437-468, Elsevier, Amsterdam. <http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=679616&fileId=S0029665189000108>. Consultada el 17 de enero de 2016.
- Bauman, D. E. and W. B. Currie. 1980. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: A review of mechanisms involving homeostasis and homeorrhesis. *Journal of Dairy Science* 63: 1514-1529.
- Bell, A. W. 1995. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of Animal Science* 73: 2804-2819.
- Bell, A. W., Slepatis R., and R. A. Ehrhardt. 1995. Growth and accretion of energy and protein in the gravid uterus during late pregnancy. *Journal of Dairy Science* 78: 1954-1961.

- Bellido, T. 2000. Calbindin-D28k is expressed in osteoblastic cells and suppresses their apoptosis by inhibiting caspase-3 activity. *Journal of Biological Chemistry* 275(34): 26328-26332.
- Block, E. 2010. Transition cow research-what makes sense today? *In: High Plains Dairy Conference*. Amarillo, Texas. p. 75.
- Bronner, F. 2003. Mechanisms and functional aspects of intestinal calcium absorption. *Journal of Experimental Zoology* 300: 47-52.
- Carson, M. E. 2009. The association of selected metabolites in peripartum dairy cattle with health and production. Master Science Thesis, University of Guelph. Ontario, Canada. 132 p. https://books.google.com.mx/books/about/The_Association_of_Selected_Metabolites.html?id=AmVXCzYnng0C&redir_esc=y. Consultada el 3 de junio de 2015.
- Cermakova, J., V. Kudrna, M. Simeckova, A. Vyborna, P. Dolezal, and J. Illek. 2014. Comparison of shortened and conventional dry period management strategies. *Journal of Dairy Science* 97: 5623-5636.
- Chapinal, N., M. E. Carson, S. J. LeBlanc, K. E. Leslie, S. Godden, M. Capel, J. E. P. Santos, M. W. Overton, and T. F. Duffield. 2012. The association of serum metabolites in the transition period with milk production and early-lactation reproductive performance. *Journal of Dairy Science* 95: 1301-1309.
- Choi, M., U. L. Scholl, P. Yue, P. Björklund, B. Zhao, C. Nelson-Williams, W. Ji, Y. Cho, A. Patel, C. J. Men, E. Lolis, M. V. Wisgerhof, D. S. Geller, S. Mane, P. Hellman, G. Westin, G. Akerström, W. Wang, and R. P. Lifton. 2011. K⁺ channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension. *Science* 331: 768-772.
- Contreras, G. A., and L. M. Sordillo. 2011. Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 34: 281-289.
- Cross, H. S., T. Nittke, and E. Kallay. 2011. Colonic vitamin D metabolism: implications for the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colorectal cancer. *Molecular Cell Endocrinology* 347: 70-79.

- Cross, H.S., H. Debiec, and M. Peterlik. 1990. Thyroid hormone enhances the genomic action of calcitrol in the small intestine. *Program Clinical Biology Research* 332: 163-180.
- Dann, H. M., N. B. Litherland, J. P. Underwood, M. Bionaz, A. D'Angelo, J. W. McFadden, and J. K. Drackley. 2006. Diets during far-off and close-up dry periods affect periparturient metabolism and lactation in multiparous cows. *Journal of Dairy Science* 89: 3563-3577.
- Dimitriadis, G., P. Mitrou, and V. Lambardi. 2006. Insulin action in adipose tissue and muscle in hypothyroidism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 91: 4930-4937.
- Dimitriadis, G., and E. A. Newsolme. 2004. Integration of some biochemical and physiologic effects of insulin that may play a role in the control of blood glucose concentration. In: *Diabetes Mellitus, a Fundamental and Clinical Text*. 3rd ed. Walden Hold Press. Philadelphia. pp: 183-197.
- Dimitriadis, G., M. Parry-Billings, S. Bevan, B. Leighton, U. Krause, T. Piva, K. Tegos, R. A. J. Challiss, G. Wegener, and E. A. Newsolme. 1997. The effects of insulin on transport and metabolism of glucose in skeletal muscle from hyperthyroid and hypothyroid rats. *European Journal of Clinical Investigation* 27: 475-483.
- Dimitriadis, G., I. Vlachonikolis, E. Hatziaellaki, A. Linos, O. Kordonouri, E. Alexopoulos, and S. Raptis. 1988. The 'dawn phenomenon' in patients with type II diabetes mellitus. *Diabetes, Nutrition and Metabolism* 1: 37-41.
- Drackley, J. K. 1999. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? *Journal of Dairy Science* 82: 2259-2273.
- Drackley, J. K. 2000. Use of NEFA as a tool to monitor energy balance in transition dairy cows. *Illinois Dairy Days*. <http://livestocktrail.illinois.edu/dairynet/paperDisplay.cfm?ContentID=330>. Consultada el 21 de agosto de 2015.
- Drackley, J. K., T. R. Overton, and G. N. Douglas. 2001. Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. *Journal of Dairy Science* 84(E. Suppl.): E100-E112.

- Duffield, T. F. 2015. Update on management of transition cows. *Advances in Dairy Technology* 27: 319-330.
- Dyck, D. J. 2009. Adipokines as regulators of muscle metabolism and insulin sensitivity. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism* 34(3): 396-402.
- Eclinpath. 2015. Online textbook on Veterinary Clinical Pathology. Cornell University College. <http://www.eclinpath.com/search/>. Consultada el 18 de julio de 2015.
- Frayan, K. N. 2002. Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia* 45: 1201-1210.
- Goff, J. P., F. J. Muller, J. K. Miller, G. A. Kiess, and H. H. Dowlen. 1991. Addition of chloride to a prepartal diet high in cations increases 1,25-Dihydroxyvitamin D response to hypocalcemia preventing milk fever. *Journal of Dairy Science* 74: 3863-3871.
- Goff, J. P. 2000. Pathophysiology of calcium and phosphorus disorders. *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* 16(2): 319-337.
- Grummer, R. R. 1995. Impact in changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition cow. *Journal of Animal Science* 73: 2820-2833.
- Grummer, R. R., and R. R. Rastani. 2004. Why reevaluate dry period length? *Journal of Dairy Science* 87(E. Suppl.): E77-E85.
- Gumbier, B. M. 1996. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84: 345-357.
- Herdt, T. H. 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.
- Horst, R. L., J. P. Goff, and T. R. Reinhardt. 1994. Calcium and vitamin D metabolism in the dairy cow. *Journal of Dairy Science* 77: 1936-1951.
- Hwang, E. T. R. Tatavarty, J. Chung, and M. B. Gu. 2013. New functional amorphous calcium phosphate nanocomposites by enzyme-assisted biomineralization. *ACS Applied Materials and Interfaces* 5(3): 532-537.

- Inai, T., J. Kobayash and S. Shibata. 1999. Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells. *European Journal of Cell Biology* 78: 849-855.
- Ingvartsen, K. L. and N. C. Friggens. 2005. To what extent do variabilities in hormones, metabolites and energy intake explain variability in milk yield? *Domestic Animal Endocrinology* 29: 294-304.
- Ingvartsen, K. L. 2006. Feeding and management related diseases in the transition cow. Physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding-related diseases. *Animal Feed Science and Technology* 126: 175-213.
- Kühne, H., A. Schutkowski, S. Weinholz, C. Cordes, A. Schierhorn, K. Schulz, B. König, and G. Stang. 2014. Vitamin D receptor regulates intestinal proteins involved in cell proliferation, migration and stress response. *Lipids in Health and Disease* 13: 42-51.
- Laeger, T., H. Sauerwein, A. Tuchscherer, O. Bellmann, C. C. Metges, and B. Kuhla. 2013. Concentrations of hormones and metabolites in cerebrospinal fluid and plasma of dairy cows during the periparturient period. *Journal of Dairy Science* 96: 2883-2893.
- LeBlanc, S. 2010. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *Journal of Reproduction and Development* 56: S29-S35.
- Liu, C., L. Yiming, S. Mikhail, H. Chun, B. Gyeong-Hun, T. Yi, Z. Zhuohua, L. Xinhua, and H. Xi. 2002. Control of B-catenin phosphorylation and degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell Press* 108: 837-847.
- Lohrenz, A. K., K. Duske, F. Schneider, K. Nürnberg, B. Losand, H. M. Seyfert, C. C. Metges, and H. M. Hammon. 2010. Milk performance and glucose metabolism in dairy cows fed rumen-protected fat during mid lactation. *Journal of Dairy Science* 93: 5867-5876.
- Maehlum, S., A. T. Hostmark, and L. Hermansen. 1977. Synthesis of muscle glycogen during recovery after prolonged severe exercise in diabetic and non-diabetic subjects. *Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation* 37: 309-316.

- Mann, S., F. A. Leal Yepes, M. Duplessis, J. J. Wakshlag, T. R. Overton, B. P. Cummings, and D. V. Nydam. 2015. Dry period plane of energy: Effects on glucose tolerance in transition dairy cows. *Journal of Dairy Science* 99: 701-717.
- McArt, J. A. A., D. V. Nydam, G. R. Oetzel, T. R. Overton, and P. A. Ospina. 2013. Elevated non-esterified fatty acids and β -hydroxybutyrate and their association with transition dairy cow performance. *The Veterinary Journal* 198: 560-570.
- McGuire, M. A., J. M. Griinari, D. A. Dwyer, and D. E. Bauman. 1995. Role of insulin in the regulation of mammary synthesis of fat and protein. *Journal of Dairy Science* 78: 816-824.
- Merino, E., I. Merida, and A. Ávila-Flores. 2008. Diacylglycerol kinases: at the hub of cell signaling. *Biochemical Journal* 409: 1-18.
- Moller, D. E., and J. S. Flier. 1991. Insulin resistance--mechanisms, syndromes, and implications. *New England Journal of Medicine* 325(13): 938-48.
- Mori, M., S. Rossi, M. C. Bonferoni, F. Ferrari, G. Sandri, F. Riva, C. Del Fante, C. Perotti, and C. Caramella. 2014. Calcium alginate particles for the combined delivery of platelet lysate and vancomycin hydrochloride in chronic skin ulcers. *International Journal of Pharmaceutics* 461: 505-513.
- Murray, R. D., J. E. Horsfield, W. D. McCormick, H. J. Williams, and D. Ward. 2008. Historical and current perspectives on the treatment, control and pathogenesis of milk fever in dairy cattle. *Veterinary Record* 163: 561-565.
- Newsholme, E. A., and Leech, 1983. *Biochemistry for the Medical Sciences. Biochemical and molecular biology Education*. J. Wiley, Chichester, UK. ISBN. 952 p.
- Nijenhuis, T., J. G. J. Hoenderop, and R. J. M. Bindels. 2003. TRPV5 and TRPV6 in Ca^{2+} (re) absorption: regulating Ca^{2+} entry at the gate. *European Journal of Physiology* 451: 181-192.
- NRC. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. National Academy Press, Washington, DC. 381 p.
- Ospina, P. A., D. V. Nydam, T. Stokol, and T. R. Overton. 2010. Associations of elevated nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate

concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the northeastern United States. *Journal of Dairy Science* 93: 1596-1603.

Overton, T. R. and M. R. Waldron. 2004. Nutritional management of transition dairy cows: Strategies to optimize metabolic health. *Journal of Dairy Science* 87 (E Suppl.): E105-E119.

Perez, A. V., G. Picotto, A. R. Carpentieri, M. A. Rivoira, M. E. L. Peralta, and T. N. G. Tolosa. 2008. Minireview on regulation of intestinal calcium absorption. Emphasis on molecular mechanisms of transcellular pathway. *Digestion* 77: 22-34.

Prentice, A. 2000. Calcium in pregnancy and lactation. *Annual Review of Nutrition* 20: 249-272.

Price, A., W. Wickner, and U. Christian. 2000. Proteins needed for vesicle budding from the Golgi complex are also required for the docking step of homotypic vacuole fusion. *Journal of Cell Biology* 148(6): 1223-29.

Reynolds, C. K., P. C. Aikman, B. Lupoli, D. J. Humphries, and D. E. Beaver. 2003. Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. *Journal of Dairy Science* 86: 1201-1217.

Rossetti, L., R. A. DeFronzo, R. Gherzi, P. Stein, G. Andraghetti, G. Falzetti, G. I. Shulman, E. Klein-Robbenhaar, and R. Cordera. 1990. Effect of metformin treatment on insulin action in diabetic rats: *In vivo* and *in vitro* correlations. *Metabolism Clinical and Experimental* 39: 425-435.

Sawa, A., M. Bogucki, and W. Neja. 2012. Dry period length and performance of cows in the subsequent production cycle. *Archiv Tierzucht* 55: 140-147.

Sheppard, P. R., and B. B. Kahn. 1999. Glucose transporters and insulin action-implications for Insulin resistance and diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine* 341: 248-257.

Shulman, D. I. 2000. Gastrointestinal effects of growth hormone. *Endocrine* 12: 147-152.

SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2015. Leche de bovino, producción, precio y valor. <http://www.siap.gob.mx/ganaderia-resumen-estatal-pecuario/>. Consultada el 5 de octubre de 2015.

- Stanley, C. C. 2005. Regulation of glucose metabolism in dairy cattle. Doctor of Philosophy Thesis. Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College. Louisiana, United States of America. 121 p.
- Steinberg, H. O., G. Paradisi, G. Hook, K. Crowder, J. Cronin, and A. D. Baron. 2000. Free fatty acid elevation impairs insulin-mediated vasodilation and nitric oxide production. *Diabetes* 49: 1231-1238.
- Suzuki, R., A. Suzuki, M. Nomoto, H. Toyoda, L.J. Wu, H. Xu, MG. Zhao, K. Ueda, A. Kitamoto, N. Mamiya, T. Yoshida, S. Homma, S. Masushige, M. Zhuo, and S. Kida. 2008. Upregulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV improves memory formation and rescues memory loss with aging. *Journal of Neuroscience* 28(40): 9910-9919.
- Teitelbaum, S. L. 2000. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289: 1504-1508.
- Teixeira, M. C., M. I. Braghiroli, J. Sabbaga, and P. M. Hoff. 2014. Primary prevention of colorectal cancer: myth or reality? *World Journal Gastroenterology* 20(41): 15060-15069.
- Van Saun, R. J. 2015. Transition cow management. Department of Veterinary & Biomedical Sciences. The Pennsylvania State University. <http://extension.psu.edu/animals/dairy/courses/technology-tuesday-series/webinars/dairy-systems-planning-and-building-transition-cow-housing-and-management/transition-cow-management/view>. Consultada el 10 de noviembre de 2015.
- Vickers, L. M., 2011. Controlling energy intake in the prepartum period to improve transition cow health. Thesis of Master of Science. University of British Columbia, Vancouver, B.C. 45 p.
- Zoidis, E., M. Gosteli-Peter, C. Ghirlanda-Keller, L. Meinel, J. Zapf, and C. Schmid. 2002. IGF-I and GH stimulate Phex mRNA expression in lungs and bones and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ production in hypophysectomized rats. *European Journal of Endocrinology* 146: 97-105.

3 Ácidos grasos no esterificados, Calcio e Insulina en el parto y sus relaciones con producción de leche de vacas Holstein-Friesian en confinamiento

3.1 Resumen

Los objetivos del presente estudio fueron examinar las asociaciones de las concentraciones periparto de ácidos grasos no esterificados (AGNE), Calcio e insulina previos al parto y la producción de leche (PL) en el inicio de la lactancia. En el estudio se utilizaron 90 vacas Holstein-Friesian (30 de tres establos; 780 ± 36 kg PV; de más de dos lactancias) que fueron muestreadas 30, 20, 10, 3, 2, y 1 días preparto, el día de parto y 1, 2, 3, 10, 20 y 30 días posparto. Los coeficientes de disparidad más altos fueron cuando el 72.11% de los animales estuvieron por debajo del umbral de $\text{Ca} \leq 2.1 \text{ mmol L}^{-1}$ en el día 10 preparto [(coeficiente de disparidad (CD) = 2.2; intervalo de confianza (IC) del 95% = 1.8 – 2.28)] en comparación con los niveles de $\text{AGNE} \geq 0.5 \text{ mmol L}^{-1}$; donde la proporción de animales fue de 67.40% (CD = 0.8; IC del 95% = 0.30 – 1.14) o insulina $\leq 0.26 \text{ ng mL}^{-1}$ con una proporción del 6.02% de animales en el grupo de riesgo alto (CD = 0.8; IC del 95% = 1.61 – 1.90). En el día 10 posparto, los coeficientes de disparidad más altos fueron cuando el 66.41% de los animales estuvieron por debajo del umbral de $\text{Ca} \leq 2.1 \text{ mmol L}^{-1}$ (CD = 1.4; IC del 95% = 0.90 – 2.60) en comparación con los niveles de $\text{AGNE} \geq 0.5 \text{ mmol L}^{-1}$ con la proporción de animales de 22.00% (OR = 0.9; IC del 95% = 0.89 – 2.13) o insulina $\leq 0.26 \text{ ng mL}^{-1}$ con una proporción del 29.70% de animales (OR = 0.7; IC del 95% = 0.7 – 2.01). Los coeficientes de disparidad más altos fueron cuando el 40.00% de los animales estuvieron por debajo del umbral de $\text{Ca} \leq 2.1 \text{ mmol L}^{-1}$ en el día 10 preparto (OR = 2.5; IC del 95% = 1.8 – 2.90) en comparación con los niveles de $\text{AGNE} \geq 0.5 \text{ mmol L}^{-1}$ cuando la proporción fue de 20.00% (OR = 0.5; IC del 95% = 0.50 – 1.31) o insulina $\leq 0.26 \text{ ng mL}^{-1}$ con una proporción del 15.12% de animales en el grupo de riesgo alto (OR = 0.9; IC 95% = 1.81 – 2.2). En conclusión, varios umbrales a nivel de vacas fueron

identificados con proporciones de AGNE e insulina alta, y concentraciones de Ca reducidas en los últimos días de gestación y los 10 y 20 días posparto asociados con riesgo alto para pérdidas de producción de leche.

Palabras clave: Ácidos grasos no esterificados, insulina, calcio, parto, postparto

Abstract

Non-esterified fatty acids, calcium and insulin in prepartum and its relations with milk yield at early lactation in Holstein-Friesian cows

The objectives of this study were to examine the associations of peripartum concentrations of non-esterified fatty acids (NEFA), Calcium and insulin before parturition and milk yield (MY) in early lactation. In the study, 90 Holstein-Friesian (780 ± 36 kg BW; 30 per farm; which had lactated more than twice) were used. Cows were sampled by jugular venipuncture at 30, 20, 10, 3, 2 and 1 d before parturition, the d of birth and 1, 2, 3, 10, 20 and 30 d postpartum. The odd ratio for MY loss were higher when 72.11% of the animals were below the threshold of $\text{Ca} \leq 2.1 \text{ mmol L}^{-1}$ on day 10 prepartum [(Odd ratio = OR) = 2.2; confidence interval (CI) 95% = 1.8 - 2.28)] compared with $\text{NEFA} \geq 0.5 \text{ mmol L}^{-1}$; where the proportion of animals was 67.40% (OR = 0.8; 95% CI = 0.30 - 1.14) or $\text{insulin} \leq 0.26 \text{ ng mL}^{-1}$ with a ratio of 6.02% of animals in the high-risk group (OR = 0.8; 95% CI = 1.61 - 1.90). On day 10 postpartum, the odd ratios for MY loss were higher when 66.41% of the animals were below the threshold of $\text{Ca} \leq 2.1 \text{ mmol L}^{-1}$ (OR = 1.4; 95% CI = 0.90 - 2.60) compared with levels of $\text{NEFA} \geq 0.5 \text{ mmol L}^{-1}$ with the proportion of animals 22.00% (OR = 0.9; 95% CI = 0.89 - 2.13) or $\text{insulin} \leq 0.26 \text{ ng mL}^{-1}$ with a ratio of 29.70% of animals (OR = 0.7; 95% CI = 0.7 - 2.01). The odd ratios were highest when 40.00% of the animals were below the threshold of $\text{Ca} \leq 2.1 \text{ mmol L}^{-1}$ on day 10 prepartum (OR = 2.5; 95% CI = 1.8 - 2.90) compared with levels $\text{NEFA} \geq 0.5 \text{ mmol L}^{-1}$ when the ratio was 20.00% (OR = 0.5; 95% CI = 0.50 - 1.31) or $\text{insulin} \leq 0.26 \text{ ng mL}^{-1}$ with a ratio of 15.12% of animals in the high risk group (OR = 0.9; 95% CI = 1.81 - 2.2). In conclusion, several cows level thresholds were identified with high proportions of NEFA and insulin, and reduced concentrations of Ca in the last d of gestation and 20 d postpartum 10, and they were associated with high risk for loss of milk.

Key Words: Non-esterified fatty acid, calcium, insulin, prepartum, postpartum

3.2 Introducción

La producción de leche (PL) en el inicio de la lactancia depende del manejo nutricional durante el periodo seco^(1,2). Este periodo es crítico debido a que se conjuntan los requerimientos energéticos de crecimiento fetal, inicio de la lactancia y la reducción del consumo de materia seca (CMS) alrededor del parto^(3,4). Durante este lapso es necesaria la regulación homeorrética de las funciones metabólicas para preparar el parto y la lactancia⁽⁵⁾. Como consecuencia de dichos eventos, la vaca moviliza sus reservas corporales de grasa a través de torrente sanguíneo en forma de ácidos grasos no esterificados (AGNE) para contribuir con las necesidades de energía en este periodo⁽⁶⁾. Durante este proceso, la glucosa e insulina funcionan como los controladores principales; cuando los niveles de insulina son bajos la lipólisis incrementa dando lugar a que se liberen cantidades cuantiosas de AGNE⁽⁷⁾.

Al inicio de la lactancia la movilización de grasa es inevitable, sin embargo, esta movilización no es similar en todas las vacas⁽⁸⁾. Por ejemplo, Tamminga *et al.*⁽⁹⁾ mencionaron que durante las primeras ocho semanas postparto dicha movilización osciló entre 8.0 y 57.0 kg de grasa corporal entre vacas. Por su parte, Price *et al.*⁽¹⁰⁾ atribuyeron las diferencias a la naturaleza genética, debido a que las vacas con rendimiento lechero alto movilizaron una mayor cantidad de reservas corporales en comparación con las vacas de menor potencial genético para PL.

En dicho contexto, la vaca entra en un proceso de adaptación del metabolismo energético para la síntesis de componentes de leche y el mantenimiento de su salud. Dependiendo de la habilidad en el proceso adaptativo, la vaca podrá mantener su homeóstasis interna y logrará distribuir sus reservas energéticas no sólo para mantener los requerimientos de la secreción lechera sino también para evitar trastornos metabólicos⁽⁶⁾. Aproximadamente, 75% de las enfermedades y trastornos metabólicos de las vacas lecheras se presentan en

el primer mes postparto⁽¹¹⁾, lo que influye negativamente en el rendimiento lechero⁽¹²⁾. Varios estudios publicados previamente, reportaron asociaciones entre la concentración de metabolitos sanguíneos preparto con el volumen de leche producido o cosechado en los primeros días de lactancia. Ospina *et al.*⁽¹³⁾ concluyeron que niveles de AGNE altos en el preparto, tanto en vacas primíparas como en multíparas, redujeron aproximadamente 650.00 kg en lactancias ajustadas a 305 días. Por otra parte, Chapinal y colaboradores concluyeron que los niveles de AGNE altos y Ca bajos en la semana previa al parto, redujeron la PL en aproximadamente 1.6 a 3.2 kg d⁻¹ en los primeros 120 días en leche⁽⁶⁾. Los mismos autores concluyeron que niveles séricos de Ca bajos, desde una semana antes del parto hasta la tercera semana postparto se relacionaron con pérdidas en PL.

Relaciones similares se han observado con relación a los niveles séricos preparto y posparto de insulina. Weber y colaboradores indicaron que las vacas altas productoras reducen sus niveles plasmáticos de glucosa en el inicio de la lactancia; lo que se asoció con una reducción en la concentración plasmática de insulina⁽⁸⁾. Sin embargo, dichas concentraciones difieren de acuerdo al grado de movilización de grasa corporal. Por ejemplo, las vacas que movilizan cantidades pequeñas de reservas corporales tienden a concentrar un volumen más alto de insulina en plasma, comparado con las vacas que movilizan mayores cantidades de reservas corporales en forma de AGNE.

Como se indicó anteriormente, las pérdidas económicas por disminución en volumen de leche cosechado representan sólo la “punta del iceberg”; debido a los problemas periparto generan gastos por medicinas, aumento en mano de obra y en ocasiones desecho prematuro de las vacas. En dicho contexto, la creación de pruebas rápidas o experimentales que permitan predecir el volumen inicial de leche o evitar la presencia de trastornos metabólicos como hipocalcemia, fiebre de leche o desplazamiento de abomaso mediante un nivel de metabolito alterado se ha vuelto una meta importante.

Con base en lo anterior, los objetivos del presente estudio fueron demostrar la existencia de una asociación entre la concentración sérica de ácidos grasos no esterificados, Ca e insulina previos al parto y la producción de leche inicial en vacas Holstein-Friesian en condiciones de confinamiento.

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 Localización del área de estudio

El estudio se llevó a cabo en tres establos lecheros ubicados en la Comarca Lagunera, en un radio no mayor de 150 kilómetros entre uno y otro. Los establos se seleccionaron con base en la disponibilidad de sus directores para participar en el estudio; los elegidos cumplieron con los criterios de tener aproximadamente 2,000 vacas en línea de ordeño, manejo con dos ordeños por día y dietas completas de Sorgo-Soya.

El establo Beta Santa Mónica se localiza en San Pedro, Coahuila, a 1,100 m (25°44'36" N y 103°10'22" O). Beta San Gabriel se localiza en Francisco I. Madero, Coahuila, a 1,108 m (25°48'25"N y 103°13'32" O) y La Rosita se localiza en Torreón, Coahuila, a 1,120 m (25°51'86" N y 103°34'36"O). El clima de la región es desértico. La precipitación es de aproximadamente 300 mm anuales distribuidos principalmente de julio a septiembre⁽¹⁴⁾.

3.3.2 Manejo y medición de las vacas

Los animales utilizados en el estudio fueron aproximadamente 90 vacas Holstein-Friesian (30 por establo) en gestación, de aproximadamente 30 días antes de la fecha probable de parto. El peso corporal (PV) aproximado fue de 780 ± 36 kg, con condición corporal de 3.0 (escala 1, delgada a 5, gorda) y con más dos lactancias. Con base en reportes previos, aproximadamente 30 vacas por hatos fueron suficientes para detectar la prevalencia de concentraciones

elevadas de metabolitos en un intervalo de confianza de 5 a 95%⁽⁶⁾. Las fechas probables de partos se obtuvieron de las listas generadas por el software Dairy Comp 305 (DairyComp 305, Valey Ag Software, Tulare, CA; PC Dart, Dairy Records, Management System, Raleigh, NC). Los animales se seleccionaron por la PL en la lactancia previa, CC y libres de enfermedades aparentes, estos se muestrearon a los 30, 20, 10, tres, dos y un día antes del parto, el día del parto y uno, dos, tres, 10, 20 y 30 días postparto (-30d, -20d, -10d, -3d, -2d, -1, 0d, +1d, +2d, +3d, +10d, +20d, +30d).

En cada muestreo, se colectó una muestra de sangre de aproximadamente 10.0 mL de los mismos animales de la arteria o de la vena coccígea en tubos vacutainer sin anticoagulante (Beckton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Las muestras fueron conservadas en refrigeración y se permitió su coagulación. La sangre se centrifugó, el suero se separó y se almacenó a - 20° C dentro de un periodo no mayor a las seis horas de colección. El escore de CC fue observado al inicio y durante cada semana; y se evaluó con una escala de 1: delgada y 5: gorda con variaciones de 0.25⁽¹⁵⁾. Los directores de los establos fueron instruidos para observar enfermedades o eventos no saludables en los animales. Las enfermedades o eventos incluidos fueron desplazamiento de abomaso, partos distócicos, cetosis, mastitis, metritis, fiebre de leche y retención placentaria. Los técnicos instruyeron a los directores de establos mediante discusiones verbales o boletines con las definiciones de las enfermedades, para uniformizar criterios y estandarizar la información colectada. Las definiciones de las enfermedades ya han sido descritas anteriormente⁽¹⁶⁾.

3.3.3 Análisis del suero sanguíneo

Las muestras se analizaron para AGNE e insulina en los laboratorios de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Los AGNEs se determinaron con un kit HR series NEFA-HR (2 ACS-ACOD method Wako Pure Chemical Industries, Mountain View, CA., USA) siguiendo los procedimientos de los fabricantes; mientras que el Ca se analizó con un kit para Ca denominado Calcium Colorimetric Method; distribuido por Randox Laboratories Limited (County Antrim, QY., UK). La determinación de insulina se realizó mediante ensayo por inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA).

3.3.4 Análisis del alimento

Los muestreos de sangre fueron acompañados por muestreos de alimento. Las muestras de alimento correspondieron a dietas diferentes de acuerdo a las etapas y los establos. Por ejemplo, el día 30 parto correspondió a dietas en transición; mientras que en el día 10 parto fue de reto y finalmente, a los 30 días posparto fue para vacas frescas. Después de la colección, las muestras se pesaron y secaron en una estufa de aire forzado por 48 h y se volvieron a pesar para determinar la materia seca de campo parcial. Posteriormente, las muestras se molieron en un molino Willey (A. H. Thomas, Philadelphia, PA). La materia seca total se determinó utilizando una estufa a 100 °C durante 24 h. Para determinar el contenido de cenizas y materia orgánica (MO) las muestras se incineraron en mufla a 500 °C. Las fibras detergente neutro (FDN) y detergente ácido (FDA) se determinaron usando el método de Goering y Van Soest⁽¹⁷⁾, y para determinar el contenido de proteína cruda (PC) se utilizó el método Kjeldahl⁽¹⁸⁾.

3.3.5 Análisis estadísticos

Los datos fueron analizados con SAS (versión 9.2; SAS Institute Inc., Cary, NC). Las diferencias entre AGNE, Ca e insulina en las vacas, entre ranchos y fechas de muestreos fueron analizados con un modelo mixto (Proc Mixed; SAS Institute Inc., Cary, NC) con medidas repetidas dentro de vaca (anidadas dentro de hato) y considerando hato como aleatorio. La CC fue categorizada como delgada (≤ 2.0), moderada (2.25 – 2.75) o gorda (≥ 3.0); mientras que la PL se agrupó como baja (≤ 18.20), media (18.21 – 36.33) y alta ($\geq 36.33 \text{ kg d}^{-1}$). Para determinar la asociación entre PL y las concentraciones séricas AGNE, Ca e insulina se realizaron análisis univariados por fecha de muestreo con variables categóricas como fecha de parto, CC y establo.

Las variables de interés fueron la proporción de animales muestreados con los niveles séricos de AGNE, Ca e Insulina dentro de los primeros 30 días de lactancia, debido a que las asociaciones entre concentraciones preparto de AGNE, Ca e Insulina, y los volúmenes de leche perdidos posparto fueron más robustos cuando se usó la producción de los días 10 y 20 de lactancia⁽¹⁹⁾.

Las relaciones temporales entre AGNE, Ca e insulina con PL sólo se mantienen cuando los metabolitos y hormonas fueron tomadas antes de que las vacas se ordeñarán por primera vez. Dicho criterio fue utilizado para establecer asociaciones entre las concentraciones preparto y la PL posterior. Para cada metabolito u hormona y fecha de muestreo, se hicieron al menos dos tipos de umbrales (alto y bajo). Los umbrales se formaron siguiendo la metodología propuesta por Chapinal *et al.* (2011). Para predecir el volumen de leche perdido, se utilizó la categorización de las vacas en grupos de bajo, medio y alto riesgo. Para el día 10 preparto, los umbrales considerados a nivel de vaca fueron para AGNE ≥ 0.5 y 0.7 mmol L^{-1} ; Ca ≤ 2.1 y 0.30 mg dL^{-1} e insulina ≤ 0.26 y 0.30 ng mL^{-1} . Para los 10 y 20 días posparto, los umbrales considerados fueron AGNE ≥ 0.7 y $1.0; \text{ mmol L}^{-1}$; Ca ≤ 2.1 y 0.30 mg dL^{-1} e insulina ≤ 0.30 y 0.50 ng mL^{-1} .

En cada fecha de muestreo y en cada umbral se calculó la proporción de grupos de animales muestreados de riesgo alto para cada estable. En forma similar, para cada semana de muestreo y para cada umbral de AGNE, Ca e insulina se crearon grupos con incrementos de 5.0 puntos porcentuales de la proporción de animales en el grupo con concentraciones de riesgo alto (por ejemplo, $\geq 10\%$ de vacas con concentraciones de AGNE preparto $\geq 0.5 \text{ mmol L}^{-1}$, $\geq 15\%$ con $\geq 0.5 \text{ mmol L}^{-1}$, y $\geq 20\%$ con $\geq 0.5 \text{ mmol L}^{-1}$, y sucesivamente). Dicha forma determinó la ruta de búsqueda de las asociaciones entre individuos a nivel del mismo estable.

Para estudiar la diferencia entre los diferentes umbrales se crearon variables Dummy jerárquicas designando el valor de 1.0 para las vacas consideradas de riesgo alto (proporción de animales considerados dentro del grupo de riesgo alto o por encima del umbral) y 0.0 (por ejemplo, vacas con concentraciones de AGNE preparto $\geq 0.5 \text{ mmol L}^{-1}$, se le asignó el valor de 1.0 para ese umbral particular y con concentraciones de AGNE preparto $< 0.5 \text{ mmol L}^{-1}$, se le asignó un valor de 0.0).

En la mayoría de los umbrales, el nivel medio funcionó como el punto de referencia. En los análisis finales, sólo se usaron umbrales conteniendo al menos el 10% de los animales muestreados en el hato y que estuvieron en una categoría de posible incremento de riesgo.

Las diferencias en los resultados entre las vacas de bajo y alto riesgo fueron contrastados usando modelos lineales (Proc GLM, SAS Institute Inc.). La proporción de animales muestreados y diagnosticados con niveles riesgosos se consideraron como variables continuas, y las vacas tomaron valores entre 1.0 y 0.0. En este contexto, cuando se aplica un modelo lineal directamente a las proporciones, el estimador de la media y el intervalo de confianza deberían estar contenidos en el rango de 0.0 a 1.0. Para asegurar que los estimadores e intervalos de confianza se calcularán correctamente, se usó la transformación logit con un factor de corrección por sesgo de 0.25 a 0.50 y se aplicó a los animales muestreados antes y después del parto. Esta transformación fue

necesaria para cubrir las suposiciones de normalidad y homogeneidad de varianzas. Para cada umbral de concentraciones de metabolitos y hormonas se crearon modelos multivariados separados incluyendo las proporciones dicotomizadas de animales en el grupo de riesgo alto (el umbral 1.0 codificado como una variable Dummy a un tiempo), la proporción de vacas muestreadas en el hato, el establo y las posibles interacciones.

En algunos casos, cuando fue requerido, las variables e interacciones fueron removidas del modelo final manualmente si $P > 0.05$. De cada modelo, el umbral con coeficiente β positivo en la escala logit (caso de AGNE, Ca e insulina preparto y un coeficiente negativo (caso de PL) y el valor de probabilidad más bajo fueron elegidos como los umbrales óptimos para predecir pérdidas en PL en los 10 y 20 días posparto. En los casos donde hubo un umbral similar en resultado y fecha de muestreo, la elección del mismo se basó en la concentración más alta de AGNE y Ca; la concentración más baja para insulina. También se examinaron los residuales de cada modelo para verificar la normalidad y la homogeneidad de varianzas y para detectar posibles valores aislados u observaciones anormales que pudieran influir en los resultados.

En el caso de la PL donde se aplicó la transformación logit, los coeficientes fueron retransformados y los resultados se presentan como coeficientes de disparidad y los intervalos de confianza entre animales por arriba y por debajo del umbral de referencia. El coeficiente de disparidad expresa la ventaja o probabilidad de experimentar un evento (por ejemplo, leche producida o no cosechada) para un grupo de riesgo alto (por arriba del umbral) cuando se compara con uno de riesgo bajo (por debajo del umbral). Los resultados de PL se presentan como la diferencia en PL (kg d^{-1}) \pm el error estándar entre umbrales por encima o debajo del umbral del hato de producción.

3.4 Resultados

Aproximadamente 90 vacas (30 por establo) fueron muestreadas 13 veces de acuerdo al calendario indicado anteriormente. En total, 252 registros se utilizaron para establecer las relaciones entre las concentraciones séricas de AGNEs, Ca e insulina, a los 30, 20, 10, 3, 2, y 1 días preparto, el día de parto, y 1, 2, 3, 10, 20 y 30 días después de parto con PL. Las muestras colectadas los días 30, 20 y 3, 2, 1 preparto, el día de parto, y 1, 2, 3, y 30 días posparto no fueron incluidas en los análisis de PL debido a las asociaciones bajas de metabolitos e insulina con el volumen de leche producido los días 10 y 20 posparto.

El Cuadro 1 muestra la PL, CC, los niveles séricos de AGNEs, Ca e insulina observados en las vacas de los tres establos. El Cuadro 2 muestra las concentraciones séricas de los metabolitos y hormona obtenidas por fecha de muestreo independientemente del establo de procedencia. En los primeros análisis, las concentraciones de AGNEs bajas, insulina media y Ca bajos en los primeros 10 días antes del parto se asociaron con volúmenes de leche perdidos en los días 10 y 20 posparto, cuando cada metabolito fue analizado por separado (Cuadro 3). Los umbrales que demostraron la asociación con PL perdida o no cosechada más alta fueron cuando los AGNEs $\geq 0.5 \text{ mmol L}^{-1}$ e insulina con ≤ 0.26 y 0.30 ng mL^{-1} en el día 10 preparto. Cuando la PL se analizó por separado, a los 20 días posparto, la asociación entre PL y los umbrales de nutrientes fue similar al día 10. Los modelos de control de producción presentaron estimadores e interacciones entre CC y concentraciones preparto de metabolitos que no fueron significativos en ninguno de los casos ($P > 0.36$).

Cuando los niveles séricos de AGNEs, Ca e insulina (dicotomizados en el umbral seleccionado como óptimo) se combinaron en el mismo modelo en el día 10 previo al parto, solamente los AGNEs $\geq 0.5 \text{ mmol L}^{-1}$ (estimador = $- 1.5 \pm 0.8 \text{ kg d}^{-1}$; $P < 0.01$) e insulina $\leq 0.30 \text{ ng mL}^{-1}$ (estimador = $- 1.6 \pm 0.2 \text{ kg d}^{-1}$; $P <$

0.0001) permanecieron en el modelo después de controlar los efectos de fecha de parto, días en leche (lineal y cuadrático) y CC. Cuando se estratificó por fecha de parto, únicamente las concentraciones séricas de AGNEs permanecieron en el modelo.

Las concentraciones altas de AGNEs, insulina media y Ca bajo en los días 1, 2, 3 y 30 posparto se relacionaron débilmente o nada con pérdidas en PL en el día 10; lo que motivó que muchas relaciones no se reportaran en el presente documento. De hecho, las concentraciones de AGNEs bajas se asociaron con incrementos en PL en el día 10 posparto. Todos los umbrales de AGNEs por debajo de ≥ 0.5 y 0.7 mmol L^{-1} en el día 30 posparto fueron asociados con PL altas (por ejemplo, vacas con concentraciones de AGNEs al mismo nivel o por debajo del umbral óptimo produjeron más leche que las vacas con concentraciones por encima de los mismos umbrales).

Cuando los niveles séricos de AGNEs, Ca e insulina se determinaron en el día 10 preparto, y se relacionaron con los niveles obtenidos en el día 10 posparto (dicotomizados en el umbral seleccionado como óptimo), y se combinaron en el mismo modelo, solamente AGNEs $\geq 0.5 \text{ mmol L}^{-1}$ (estimador = $- 2.0 \pm 0.8 \text{ kg d}^{-1}$; $P < 0.01$), Ca $\geq 0.5 \text{ mmol L}^{-1}$ (estimador = 1.2 ± 0.6 ; $P < 0.001$) e insulina $\leq 0.30 \text{ ng mL}^{-1}$ (estimador = $- 1.1 \pm 0.5 \text{ kg d}^{-1}$; $P < 0.01$) medidos en el día 10 posparto permanecieron en el modelo después de remover los efectos de días en leche, CC y fecha de parto.

Considerando exclusivamente los niveles séricos de AGNEs e Insulina cuantificados el día 10 preparto y PL en el día 10 posparto, solamente AGNEs $\geq 0.7 \text{ mmol L}^{-1}$ medidos en el día 10 posparto permaneció en el modelo después de controlar los efectos de días en leche (lineal y cuadrático), CC y fecha de parto.

En los casos donde los niveles séricos de AGNEs, Ca e Insulina se cuantificaron en el día 10 preparto y los días 10 y 20 posparto (dicotomizados en el umbral seleccionado como óptimo), y se combinaron en el mismo modelo, solamente AGNEs $\geq 0.5 \text{ mmol L}^{-1}$ (estimador = $- 1.7 \pm 0.4 \text{ kg d}^{-1}$; $P < 0.03$), Ca

$\leq 0.5 \text{ mmol L}^{-1}$ (estimador = 1.6 ± 0.30 ; $P < 0.001$) e insulina $\leq 0.30 \text{ ng mL}^{-1}$ (estimador = $-1.9 \pm 0.6 \text{ kg d}^{-1}$; $P < 0.01$) medidos en el día 10 posparto permanecieron en el modelo después de controlar los efectos de días en leche, CC y fecha de parto.

El Cuadro 3 muestra la proporción de animales en el umbral de metabolitos de alto riesgo, los coeficientes de disparidad y los intervalos de confianza por umbrales. Los análisis fueron realizados siguiendo el mismo patrón de los grupos de riesgo de leche perdida. En el día 10 preparto, el umbral de AGNEs $\geq 0.5 \text{ mmol L}^{-1}$ una proporción aproximadamente de 67.40% de animales estarían en posibilidad de perder leche con un coeficiente de disparidad de aproximadamente 0.8; un intervalo de confianza de Wald del 95% de 0.30 – 1.40; $P < 0.06$; mientras que el umbral de Ca $\leq 2.1 \text{ mmol L}^{-1}$ donde una proporción de aproximadamente de 72.11% de animales estarían en posibilidad de perder leche con un odd ratio de aproximadamente 2.2; un intervalo de confianza de Wald del 95% de 1.80 – 2.80; $P < 0.06$. En el umbral de insulina $\leq 0.26 \text{ mmol L}^{-1}$ una proporción de aproximadamente de 6.02% de animales estarían en posibilidad de perder leche con un coeficiente de disparidad de aproximadamente 0.8; un intervalo de confianza de Wald del 95% de 0.61 – 0.90; $P < 0.06$. Las relaciones encontradas para los mismos metabolitos y hormonas en los días 10 y 20 posparto se presentan en el mismo Cuadro.

3.5 Discusión

Una preocupación de los productores lecheros es la obtención de volúmenes de leche altos y evitar la presencia de trastornos metabólicos típicos del inicio de la lactancia. Ambos aspectos sugirieron a los investigadores a enfocarse en la obtención de pruebas rápidas (directas e indirectas) con metabolitos, hormonas o enzimas en el preparto que pudieran predecir el comportamiento productivo y la presencia de trastornos metabólicos o enfermedades de las vacas en el inicio de la lactancia. Dentro de este contexto, el presente estudio tuvo como

objetivos determinar la concentración de AGNEs, Ca e insulina en el parto y se usaron como base para predecir el comportamiento de la PL en la lactancia inmediata. Aunque los hatos en estudio fueron seleccionados por conveniencia de los autores, los resultados son, probablemente, aplicables a las vacas que reúnan las condiciones de manejo similares a los establos estudiados.

En el presente estudio, la diferencia en PL a favor del establo 3 se atribuyó a diferencias en el manejo general del hato y a las condiciones ambientales locales. Las vacas se alimentaron con dietas formuladas con los mismos ingredientes (Proteína = 18.00%; EN_L = 1.75) y en proporciones similares. Sin embargo, en los establos 1 y 2, la alimentación se ofreció en dos porciones (50 y 50% cada vez), mientras que en el establo 3 se sirvió en tres porciones (33.3% cada vez) diferentes. Las vacas se ordeñaron dos veces por día, con ciertas diferencias en los horarios. Otras diferencias en el manejo diario de los animales, posiblemente, permitieron diferencias en las mediciones de PL en los días 10 y 20 posparto.

En el presente estudio, no se encontraron asociaciones entre el score de CC y volumen de leche perdido después del parto. Esto se atribuyó a que los umbrales de CC fueron formados con rangos de valores de CC estrechos, todos por debajo de 2.50. La proporción de vacas gordas fue 2.1% y puede ser considerada como rara. Dicha proporción de vacas gordas debería ser más alto si las vacas se hubieran monitoreado en los últimos días previos al parto. Sin embargo, debido a la baja variabilidad de los datos de CC, no fue posible demostrar que las asociaciones entre las calificaciones de CC y los volúmenes de leche perdidos en el inicio de la lactancia. La información de la CC con PL perdida basada en las mediciones de leche a los 10 y 20 días posparto puede no ser muy sensitivo a los cambios de las vacas en forma individual, parcialmente, debido al tiempo entre el parto y el score de CC. Dicha CC no cambio considerablemente durante este tiempo.

Por el contrario, otros estudios demostraron relaciones entre la CC y la leche perdida en el inicio de la lactancia^(20,21), en periodos secos de magnitudes

similares a las utilizadas en el presente estudio. También otros estudios fallaron para demostrar un riesgo alto de enfermedades entre vacas gordas y normales. Las asociaciones fueron no significativas^(22,23,21) o débiles^(24,20). Los resultados obtenidos en el presente estudio y otros de la literatura no refutan la importancia de la CC, sin embargo, sugieren que los metabolitos séricos proporcionan una visión más completa del estado saludable de las vacas en el corto plazo.

La relación estrecha entre los umbrales de AGNEs (óptimo $\geq 0.5 \text{ mmol L}^{-1}$) a los 10 días preparto con la PL observada a los 10 y 20 días posparto indicó que aproximadamente el 67.40% de los animales se encontró en riesgo alto de perder leche en el inicio de la lactancia; lo que se explica por la remoción de reservas corporales debido a las necesidades de nutrientes originados por la lactancia. El aumento preparto en las concentraciones de AGNEs sugiere que las vacas estuvieron en balance negativo en este tiempo y que estuvieron movilizando lípidos como una fuente de energía⁽²⁵⁾.

El incremento en las concentraciones de AGNEs circulantes ha sido directamente asociado con cantidades grandes de tejido adiposo removido durante un tiempo de deficiencia de energía⁽²⁶⁾. Dicho incremento de AGNEs es de corta duración (menor que cinco semanas), sin embargo, los resultados del presente estudio indican que niveles altos iniciaron dos días antes del parto y se mantuvieron hasta la semana cuatro-posparto. Las reducciones en la semana cuatro-posparto, probablemente, indiquen una restauración del balance negativo de energía.

El umbral de AGNEs utilizado (óptimo $\geq 0.5 \text{ mmol L}^{-1}$) para predecir una reducción en la PL fue el mismo que el observado en la predicción de desplazamiento para abomaso utilizado en estudios llevados a cabo en varios estados de Canadá y la Unión Americana ^(6,19,27).

En otros estudios se ha reportado que las concentraciones preparto de AGNEs $\geq 0.33 \text{ mEq L}^{-1}$ resultaron en una reducción de 683.00 kg de leche con lactancias de 305-d corregidas por equivalente maduro en vacas y vaquillas⁽¹³⁾. Sin embargo, la PL incremento en 488 kg de leche por lactancia cuando las

vaquillas fueron muestreadas posparto y el nivel de AGNEs fue más alto (≥ 0.57 mEq L⁻¹). En contraste, en vacas adultas posparto, la PL se redujo en 647.00 kg cuando las concentraciones de AGNEs fueron ≥ 0.72 mEq L⁻¹. Con excepción de la PL en vaquillas, los autores concluyeron que el incremento en las concentraciones de séricas de AGNEs muestreadas dos semanas antes del parto tuvieron un efecto detrimental en la PL y la eficiencia reproductiva.

Las concentraciones de AGNEs altas después del parto se han asociado con PL bajas y altas. Se ha reportado que las concentraciones de AGNEs altas (1.0 y 0.9 mEq L⁻¹) se asociaron con vacas altas productoras (10,800 kg de leche por 305-d); mientras que las concentraciones de AGNEs bajas (0.7 y 0.5 mEq L⁻¹) se asociaron con las vacas poco productoras (6,900 kg por 305-d) en la semana uno y dos posparto, respectivamente⁽²⁹⁾.

De acuerdo al conocimiento de los autores, este es el primer estudio que reporta una asociación entre los niveles séricos de insulina preparto y el volumen de leche perdido en los primeros 20 días de la lactancia. El umbral óptimo ≤ 0.26 ng mL⁻¹ se relacionó con aproximadamente el 6.02% de vacas en riesgo alto perder leche, con un coeficiente de disparidad de 0.8. Debido a que insulina es una hormona anti-lipolítica potente, una reducción en la concentración incrementaría la tasa de lipólisis en el tejido adiposo, lo que redundaría en el incremento en las concentraciones de AGNEs, seguido por reducción en la tasa de utilización de la glucosa en el músculo. En adición a este efecto, el aumento en los AGNEs por la reducción de insulina debería entorpecer el incremento en la producción de glucosa endógena, repercutiendo en el volumen de leche sintetizado. Estos efectos de la insulina se comprueban con los estudios donde se usan pinzas o braquetes euglicémicos-hiperinsulinémicos. Se ha observado que la infusión de insulina redujo las concentraciones de AGNEs en 68.00% comparado con los niveles básicos. En el mismo intervalo de tiempo, un grupo separado de vacas que no recibieron insulina mediante el método de pinzas o braquetes, mantuvieron sus concentraciones séricas de AGNEs en 96.0% de los niveles básicos⁽³⁰⁾. En el

mismo estudio se observó que la producción de leche no se alteró, sin embargo, el porcentaje de grasa de la leche y la proteína se redujeron en un 27.0%.

En el presente estudio, las concentraciones de AGNEs, Ca e insulina por debajo del umbral óptimo en el día 10 postparto fueron asociadas con volúmenes de leche perdidos cuando la PL se cuantificó 10 y 20 días postparto; esto demostró un grado de movilización de grasa moderado al inicio de la lactancia, que puede ser crítico para obtener PL altas. Sin embargo, la magnitud excesiva o la tasa de movilización rápida de grasa de las reservas deberían causar un comportamiento metabólico no apropiado que, probablemente, sirva como predictor de la reducción de respuestas adaptativas al balance de energía negativo. Cuando ambos AGNEs e insulina estuvieron en el mismo modelo, la concentración de AGNEs se asoció estrechamente con la PL obtenida en los días 10 y 20 postparto.

En el presente estudio, se encontró que las concentraciones pre y postparto de Ca en suero se asociaron con pérdidas en PL. El umbral de Ca óptimo a nivel de vaca fue $\leq 2.1 \text{ mmol L}^{-1}$, y estuvo dentro del rango de referencia (2.10 a 2.8 mmoles L^{-1}) de acuerdo al laboratorio de análisis de Ca^{2+} en la Universidad Nacional Autónoma de México. Aproximadamente, el 72.11% de las vacas muestreadas se ubicaron en el umbral de animales de alto riesgo con un coeficiente de disparidad de 2.2 y un intervalo de confianza de Wald de 1.8 – 2.8; $P < 0.05$. Dicha relación es comparable a la observada en otros estudios, quienes utilizando un umbral parecido al del presente estudio encontraron una proporción de 73.00% de animales en el grupo de riesgo alto, cuando consideraron todos los animales⁽²⁷⁾. Sin embargo, la proporción se disminuyó a 55% cuando consideraron sólo vacas adultas. En los casos donde se consideraron todas las vacas, el estimador de leche pérdida fue de aproximadamente $3.8 \text{ kg animal}^{-1} \text{ d}^{-1}$; mientras que cuando se tomaron sólo vacas adultas, la pérdida de leche fue aproximadamente de $2.9 \text{ kg animal}^{-1} \text{ d}^{-1}$ en la semana uno postparto.

Se ha observado que en la semana uno parto, con un umbral de Ca similar al del presente estudio, aproximadamente 23.00% de las vacas estuvieron en el umbral de riesgo alto y una PL no cosechada de aproximadamente 2.6 kg por animal⁻¹ d⁻¹; mientras que en las semanas 2 y 3 posparto, el grupo de alto riesgo se redujo a 4.0%⁽⁶⁾. Los autores concluyeron que las concentraciones bajas de Ca en la semana previa al parto se asociaron con leche perdida o no cosechada en la prueba de leche realizadas en los primeros cuatro días posparto.

No se encontró ninguna asociación entre concentraciones de AGNEs e insulina altas en los primeros 30 días posparto con PL. Estos resultados no son sorprendentes, debido a que las concentraciones de AGNEs e insulina alcanzan su pico máximo en la semana 1 y 2, respectivamente⁽³¹⁾. Comúnmente, las concentraciones de AGNEs altas e insulina media han sido asociadas con producciones de leche bajas y altas. Sin embargo, la magnitud excesiva o la tasa de movilización de reservas de grasa causarían un comportamiento sub-óptimo y probablemente, funcionaría como un indicador de las reducciones de las respuestas adaptativas al balance de energía negativo.

Por otro lado, niveles de AGNEs altos e insulina bajos en los días 10 y 20 posparto fueron asociadas con PL en el día 10 posparto dentro de los rangos óptimos. Estos resultados son similares en magnitud a los observadas en enfermedades postparto y pérdida de leche, o leche no cosechada^(13,28). Estos resultados sugieren que los niveles de AGNEs altos postparto están asociados con PL al inicio de la lactancia y no necesariamente con la PL perdida promedio, lo cual debería explicarse por la hipótesis que las vacas con un potencial grande para producir leche están en riesgo de algún trastorno metabólico como cetosis, fiebre de leche o desplazamiento de abomaso, si paralelamente se presentara algunas demandas nutricionales o si alguna condición del manejo no cubriera las necesidades de los animales.

Los niveles séricos de AGNEs estuvieron por debajo del umbral (óptimo ≥ 0.5 mmol L⁻¹), insulina dentro del umbral óptimo y niveles de Ca ≤ 2.2 mmol L⁻¹ bajos en el día 10 preparto se asociaron estrechamente con pérdidas de PL en las mediciones de los días 10 y 20 posparto. A pesar de que las relaciones de metabolitos por separado indican asociaciones entre sus concentraciones y PL, cuando se toman en forma conjunta la relación resulta difícil de explicar. Como se indicó anteriormente, la concentración de AGNEs se relaciona con la remoción de las reservas corporales; mientras que la insulina modula el metabolismo de compuestos incluyendo proteínas, carbohidratos y lípidos, además, de cumplir muchas funciones vitales.

Por su parte, el Ca es requerido para la síntesis de lactosa y en muchos casos se relaciona con el consumo de materia seca. Esto subraya que el riesgo de pérdida de PL en la lactancia inicial es multifactorial y que estos metabolitos son indicadores de eventos que ocurrieron una o dos semanas antes. Los resultados del presente estudio están en acuerdo con algunos reportes de estudios de Canadá y la Unión Americana sobre la asociación predictiva de AGNEs, cuerpos cetónicos y Ca reducidos en el periodo de transición, con el subsecuente desecho de animales en los primeros 60 días en leche en la lactancia inmediata [\(32\)](#). Cuando los metabolitos y la insulina fueron probados por separado aproximadamente el 38.3% de los animales quedaron en el grupo de riesgo alto con un coeficiente de disparidad de 1.8 (1.4 – 2.2, IC; P < 0.0001) para AGNE; mientras que para el Ca fue de 1.6.

Cuando la leche se determinó en el día 10 posparto, las concentraciones de AGNE altas, insulina baja y Ca bajo en los días 10 y 20 posparto se asociaron con pérdidas en PL. Las concentraciones de Ca bajas en el día 10 preparto, el día de parto, los días 1, 2, 3, 10, 20 y 30 posparto fueron asociados con volúmenes de leche perdidos en el día 10 posparto. La magnitud de los coeficientes de disparidad para los metabolitos, insulina y los volúmenes de leche perdida o no cosechados fueron similares a los reportados por Chapinal en el 2012⁽⁶⁾

3.6 Conclusión

Los umbrales a nivel de vaca indican que aproximadamente el 70.00% de las vacas muestreadas con niveles AGNE e insulina altos, y bajos en Ca en los últimos 10 días de gestación, y los 10 y 20 días después del parto se asociaron con riesgo alto de perder leche.

3.7 Agradecimientos

Los autores están ampliamente agradecidos con Biotecap y en especial con el Ing. Juan de Dios Roldán y el M.C. Adelfo Vite por proveer las facilidades para la realización de la fase de campo del presente trabajo. El agradecimiento se hace extensivo a los propietarios y encargados de los establos donde se llevó a cabo el presente estudio.

3.8 Literatura citada

1. Grummer RR. Impact in changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition cow. *J Animal Sci* 1995; 73:2820-2833.
2. Drakley JK. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier?. *J Dairy Sci* 1999; 82:2259-2273.
3. Bell AW. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J Animal Sci* 1995; 73:2804-2819.
4. Hayirli A, Grummer RR, Nordheim EV, Crump PM. Animal and dietary factors affecting feed intake during the prefresh transition period in Holsteins. *J Dairy Sci* 2002; 85:3430-3443.
5. Bauman DE, Currie WB. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: A review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *J. Dairy Sci* 1980; 63:1514-1529.
6. Chapinal N, Carson ME, LeBlanc SJ, Leslie KE, Godden S, Capel M, Santos JEP, Overton MW, Duffield TF. The association of serum metabolites in the transition period with milk production and early-lactation reproductive performance. *J Dairy Sci* 2012(a); 95:1301-1309.
7. Herdt TH. Ruminant adaptation to negative energy balance. Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. *Vet North Amer: Food Anim Pract* 2000; 16:215-230.
8. Weber C, Hametner C, Tuchscherer A, Losand B, Kanitz E, Otten W, Singh SP, Bruckmaier RM, Becker F, Kanitz W, Hammon HM. Variation in fat mobilization during early lactation differently affects feed intake, body condition, and lipid and glucose metabolism in high-yielding dairy cows. *J Dairy Sci* 2013; 96:165-180.
9. Tamminga S, Luteijn PA, Meijer RGM. Changes in composition and energy content of liveweight loss in dairy cows with time after parturition. *Livest Production Sci* 1997; 52:31-38.
10. Pryce JE, Coffey MP, Simm G. The relationship between body condition score and reproductive performance. *J Dairy Sci* 2001; 84:1508-1515.
11. LeBlanc SJ, Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *J Reproduction Dev* 2010; 56: S29-S35.

12. McArt JAA, Nydam DV, Oetzel GR, Overton TR, Ospina PA. Elevated non-esterified fatty acids and β -hydroxybutyrate and their association with transition dairy cow performance. *Vet J* 2013; 198: 560-570.
13. Ospina PA, Nydam DV, Stokol T, Overton TR. Evaluation of nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. *J Dairy Sci* 2010(a); 93:546-554.
14. García E. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía. UNAM. México. 2005. 5ta. ed. p. 16-20. http://www.igeograf.unam.mx/sigg/utilidades/docs/pdfs/publicaciones/geo_siglo21/serie_lib/modific_al_sis.pdf. Consultada el 25 de noviembre de 2014.
15. Wildman EE, Jones GM, Wagner PE, Bowman RL. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *J Dairy Sci* 1982; 65:495-501.
16. LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, TenHag J, Walton JS, Johnson WH. The Effect of Prepartum Injection of Vitamin E on Health in Transition Dairy Cows. *J. Dairy Sci* 2002; 85:1416-1426.
17. Goering HK, Van Soest PJ. Forage fiber analyses (Apparatus, reagents, procedures, and some applications). 1970. Agriculture Handbook No. 379. ARS-USDA, Washington DC, USA. ARS-USDA Press Inc.
18. AOAC. (Association of Official Analytical Chemists). Official methods of analysis. 15th. Ed. 1990. Association of Official Analytical Chemists Press. Arlington, Virginia, USA. 684 p.
19. Chapinal N., Carson M, Duffield TF, Capel M, Godden S, Overton MW, Santos JEP, LeBlanc SJ. The association of serum metabolites with clinical disease during the transition period. *J Dairy Sci* 2011; 94:4897-4903.
20. Pedron O, Cheli F, Senatore E, Baroli D, Rizzi R. Effect of body condition score at calving on performance, some blood parameters, and milk fatty acid composition in dairy cows. *J Dairy Sci* 1993; 76:2528-2535.
21. Domecq JJ, Skidmore AL, Lloyd JW, Kaneene JB. Relationship between body condition scores and milk yield in a large dairy herd of high yielding Holstein cows. *J Dairy Sci* 1997; 80:101-112.
22. Waltner SS, McNamara JP, Hillers JK. Relationships of body condition score to production variables in high producing Holstein cattle. *J Dairy Sci* 1993; 76:3410-3419.

23. Ruegg PL, Milton RL. Body condition scores of Holstein cows on Prince Edward Island, Canada: relationships with yield, reproductive performance, and disease. *J Dairy Sci* 1995; 78:552-564.
24. Markusfeld O, Galon N, Ezra E. Body condition score, health, yield and fertility in dairy cows. *Vet Rec* 1997; 141: 67-72.
25. Duffield T. 2000. Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. *Vet North Ame. Food Animal Pract.* 16(2): 231-53.
26. Bernabucci U, Ronchi B, Lacetera N, Nardone A. Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. *J Dairy Sci* 2005; 88:2017-2026.
27. Chapinal N., LeBlanc SJ, Carson ME, Leslie KE, Godden S, Capel M, Santos JEP, Overton MW, Duffield TF. Herd-level association of serum metabolites in the transition period with disease, milk production, and early lactation reproductive performance. *J Dairy Sci* 2012(b); 95:5676-5682.
28. Ospina PA, Nydam DV, Stokol T, Overton TR. Associations of elevated nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the northeastern United States. *J Dairy Sci* 2010(b); 93:1596-1603.
29. Harrison PJ, Yang MH, Lu YP. Phosphate limitation in estuarine and coastal waters of China. *J Exp Bio Ecol* 1990; 140:79-87
30. Butler ST, Pelton SH, Butler WR. Insulin increases 17 β -estradiol production by the dominant follicle of the first postpartum follicle wave in dairy cows. *Reprod* 2004; 127(5):537-45.
31. LeBlanc SJ, Lissemore KD, Kelton DF, Duffield TF, Leslie KE. Major advances in disease prevention in dairy cattle. *J Dairy Sci* 2006; 89:1267-1279.
32. Roberts T, Chapinal N, LeBlanc SJ, Kelton DF, Dubuc J, Duffield TF. Metabolic parameters in transition cows as indicators for early-lactation culling risk. *J Dairy Sci* 2012; 95:3057-3063.

Cuadro 1. Producción de leche, de ácidos grasos no esterificados (AGNE), calcio e insulina de suero sanguíneo obtenidos en diferentes fechas alrededor del parto de vacas Holstein-Friesian en confinamiento.

Item	Establo 1	Establo 2	Establo 3	P		
				Trt.	Tiempo (T)	Trt x T
Número de repeticiones	63	63	36			
Producción de leche (kg d⁻¹)	25.91 ± 3.92	26.02 ± 3.65	37.50 ± 6.14	0.0001	0.0001	0.99
Condición corporal	2.50 ± 0.03	2.63 ± 0.03	2.27 ± 0.04	0.24	0.24	0.96
Ácidos grasos no esterificados (mmol L⁻¹)	0.410 ± 0.034	0.272 ± 0.034	0.394 ± 0.04	0.01	0.0001	0.92
Calcio (mmol L⁻¹)	2.08 ± 0.16	1.73 ± 0.16	1.80 ± 0.21	0.001	0.001	0.86
Insulina (ng mL⁻¹)	2.047 ± 0.59	0.654 ± 0.59	0.722 ± 0.76	0.34	0.26	0.76

Cuadro 2. Concentraciones séricas de ácidos grasos no esterificados (AGNE), calcio e insulina muestreados en diferentes fechas preparto (n = 243) y posparto (n = 250) de vacas Holstein-Friesian de establos comerciales.

Item	AGNE, mmol L ⁻¹	Calcio, mmol L ⁻¹	Insulina, ng mL ⁻¹
Preparto (n = 243)			
Día 30	0.12 ^a	2.20 ^b	1.11 ^a
Día 20	0.13 ^a	2.02 ^b	1.54 ^a
Día 10	0.17 ^a	2.00 ^b	1.25 ^a
Día 3	0.25 ^b	1.78 ^b	0.66 ^a
Día 2	0.33 ^b	1.94 ^b	0.64 ^a
Día 1	0.51 ^b	1.82 ^b	0.59 ^a
Día de Parto	0.54 ^b	1.61 ^a	2.91 ^a
Posparto (n = 250)			
Día 1	0.46 ^b	1.62 ^a	3.40 ^a
Día 2	0.53 ^b	1.80 ^b	0.48 ^a
Día 3	0.48 ^b	1.80 ^b	0.31 ^a
Día 10	0.49 ^b	1.97 ^b	0.58 ^a
Día 20	0.36 ^b	1.88 ^b	0.64 ^a
Día 30	0.29 ^b	1.90 ^b	0.68 ^a
Error estándar	0.01	0.36	1.31
Tratamiento (Trt)	< 0.01	< 0.0001	0.19
Tiempo (T)	< 0.0001	0.0011	0.91
Trt x T	0.92	0.86	0.91

Cuadro 3. Asociación entre el nivel sanguíneo de AGNE, Calcio e insulina muestreados a los 10 días (n= 243) parto y 10 y 20 días (n = 251) posparto con producción de leche (kg d⁻¹) de vacas Holstein-Friesian en tres establos comerciales.

Item	Proporción de animales en el umbral de metabolitos de riesgo alto (%)	Coficiente de disparidad	Intervalos de confianza de Wald al 95%	P
Preparto, Día 10				
AGNE ≥ 0.5 mmol L ⁻¹	67.40	0.8	0.30 – 1.4	< 0.06
Calcio ≤ 2.1 mg dL ⁻¹	72.11	2.2	1.8 - 2.28	0.05
Insulina ≤ 0.26 ng mL ⁻¹	6.02	0.8	0.61 – 0.90	< 0.005
Posparto, Día 10				
AGNE ≥ 0.5 mmol L ⁻¹	22.00	0.9	0.89 – 2.13	0.05
Calcio ≤ 2.1 mg dL ⁻¹	66.41	1.4	0.90 – 2.60	
Insulina ≤ 0.26 ng mL ⁻¹	29.70	0.7	0.7 – 2.1	0.05
Posparto, Día 20				
AGNE ≥ 0.5 mmol L ⁻¹	20.00	0.6	0.50 – 1-31	0.07
Calcio ≤ 2.1 mg dL ⁻¹	40.00	2.5	1.8 – 2.90	0.01
Insulina ≤ 0.26 ng mL ⁻¹	15.12	0.9	0.81 – 2.2	0.02