


## Relaciones entre el $\beta$ -hidroxibutirato, el calcio y los ácidos grasos no esterificados en la sangre con pérdidas de producción de leche en la lactancia temprana



Rufino López-Ordaz <sup>a\*</sup>

Gabriela Pérez-Hernández <sup>a</sup>

Hugo Alonso Ramírez-Ramírez <sup>b</sup>

Reyes López-Ordaz <sup>c</sup>

Germán David Mendoza-Martínez <sup>c</sup>

Agustín Ruíz-Flores <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Universidad Autónoma Chapingo. Posgrado en Producción Animal. Carr. México- Texcoco. 56230. Chapingo, Estado de México. México.

<sup>b</sup>Iowa State University. Animal Science Department. Ames, IA.USA.

<sup>c</sup> Universidad Autónoma Metropolitana. Departamento de Producción Agrícola. Ciudad de México, México.

\*Autor de correspondencia: rlopezor@yahoo.com

### Resumen:

Los objetivos fueron estudiar las asociaciones de las concentraciones de  $\beta$ -ácido de hidroxibutirato (BHBA), calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y ácidos grasos no esterificados (NEFA) en el suero sanguíneo 7 días antes del parto con pérdidas en el rendimiento de la leche (RL) y disfunciones metabólicas a los días 7 y 14 de la lactancia. Se tomaron muestras de 336 vacas Holstein-Frisian ( $780 \pm 36$  kg de peso vivo) que habían lactado más de dos veces, por venipuntura coxígea, 7 días antes, y 7 y 14 días después del parto. Para cada muestra y metabolito, las concentraciones séricas se estratificaron en umbrales y se relacionaron

con el RL. En aquellos casos en que los niveles de BHBA eran elevados 7 días antes del parto y estaban relacionados con el RL en el 7° día del postparto, se observó que el 11 % de las vacas perdieron 0.370 kg día<sup>-1</sup> de leche. Por el contrario, no se observó ninguna relación entre el BHBA preparto y el RL en el 14° día de la lactancia. No se observó ninguna asociación entre los niveles elevados de NEFA y bajos de Ca<sup>2+</sup> del preparto y el RL. Las concentraciones de NEFA  $\geq 0.5$  mmol L<sup>-1</sup> en el 7° día antes del parto fueron 7.6 veces más susceptibles a la incidencia de cojera ( $P \leq 0.01$ ), y en aquellos casos en que el BHBA fue  $\geq 0.8$  mmol L<sup>-1</sup>, las vacas tuvieron 2.4 veces más probabilidades de desarrollar cetosis ( $P \leq 0.05$ ) en los primeros 60 días en leche. En resumen, los datos indican que una alta proporción de vacas está por encima de los umbrales de  $\beta$ -hidroxibutirato y de ácidos grasos no esterificados, y también son deficientes en calcio, cuando se determina una semana antes del parto. Los umbrales de riesgo de cada metabolito no se asociaron con la cantidad de leche perdida en el día 14 después del parto.

**Palabras clave:** Balance energético negativo, Biomarcadores, Metabolitos, producción de leche, Disfunciones metabólicas.

Recibido: 08/10/2018

Aceptado: 22/11/2019

## Introducción

La salud de los animales y la productividad de los hatos son los desafíos más difíciles a los que se enfrentan regularmente los productores de leche. El período alrededor del parto es crítico debido a la reducción en el consumo de materia seca (CMS), el aumento de la demanda de nutrientes, energía y calcio (Ca<sup>2+</sup>) para el mantenimiento y la síntesis de la leche. Debido a la reducción del CMS, los requerimientos de los animales no pueden ser satisfechos, y el déficit permite que el animal caiga en un balance energético negativo (BEN).

Durante la lactancia temprana, la concentración de glucosa en el suero sanguíneo es baja, con un aumento paralelo de la concentración de ácidos grasos no esterificados (NEFA), y de cuerpos cetónicos<sup>(1)</sup>. El cuerpo cetónico más destacado que circula en los rumiantes es el  $\beta$ -hidroxibutirato (BHBA), que se utiliza como fuente de energía en tejidos corporales como el cerebro, el corazón<sup>(2)</sup>, el riñón y el músculo esquelético<sup>(3)</sup>. Sin embargo, el aumento del BHBA por encima de 1.2 mmol L<sup>-1</sup> es un indicador de cetosis subclínica en las vacas lecheras<sup>(4)</sup>. El aumento de la BHBA en plasma reduce la glucosa circulante en

la sangre<sup>(5)</sup> y aumenta el riesgo de cetosis, hipocalcemia, desplazamiento abomasal y metritis con la consiguiente reducción de RL<sup>(6)</sup>.

Las mediciones de las concentraciones de BHBA, Ca<sup>2+</sup> y NEFA en torno al parto pueden ser indicadores potenciales de la capacidad de la vaca para superar los desafíos metabólicos en el período de transición, y posiblemente permitan predecir algunos riesgos de enfermedad y posibles pérdidas de rendimiento de leche (RL) al comienzo de la lactancia. Las concentraciones de calcio demuestran la capacidad de la vaca para reemplazar la pérdida extracelular de Ca<sup>2+</sup> como resultado del proceso de producción de leche, y el equilibrio entre el hueso y la eficiencia de absorción de la insulina y el Ca<sup>2+</sup><sup>(7)</sup>. Los ácidos grasos no esterificados sirven de indicador de la movilización de la grasa corporal y reflejan la particularidad de la vaca para adaptarse al BEN.

A nivel de la vaca, las reducciones de las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> en el suero, los aumentos de NEFA y BHBA se han asociado con un mayor riesgo de contraer enfermedades<sup>(8)</sup> y de pérdida de leche<sup>(9)</sup>. Los umbrales a nivel de la vaca de estos metabolitos se han utilizado para identificar a las personas que corren el riesgo de perjudicar su salud y su productividad. Sin embargo, las intervenciones individuales para reducir al mínimo los efectos indeseables del BHBA en la hipocalcemia, la cetosis u otros trastornos metabólicos en torno al parto son difíciles de lograr. Basándose en esta premisa, el objetivo de este estudio fue determinar las concentraciones séricas de β-hidroxibutirato, Ca<sup>2+</sup> y, ácidos grasos no esterificados, siete días antes del parto, y las relaciones entre ellas y las pérdidas de leche a los siete y 14 días de lactancia en vacas Holstein-Friesian en confinamiento.

## **Material y métodos**

### **Área de estudio**

El estudio se llevó a cabo en un establo lechero comercial situado en la región de la Comarca Lagunera, en el norte de México. El establo se seleccionó en base a la accesibilidad del gerente para participar en el estudio; cumplía con los criterios de tener aproximadamente 2,000 vacas de ordeño y manejar con dos ordeños por día y dietas completas de sorgo-soya. La granja está ubicada en San Pedro, Coahuila, a 1,100 m (25° 44' 36"N y 103° 10' 22" O). La temperatura en los corrales de los animales fue de 4 a 20 °C durante el período de estudio. El clima de la región es desértico. Las precipitaciones son de aproximadamente 300 mm por año, distribuidas principalmente de julio a septiembre<sup>(10)</sup>.

## Alimentación y manejo de animales

Los animales utilizados en el estudio fueron 336 vacas gestantes de raza Holstein-Friesian, aproximadamente 30 días antes de la fecha probable del parto. El peso corporal (PC) fue de aproximadamente  $780 \pm 36$  kg, con un puntaje de condición corporal (PCC) de 3.5 (escala 1= delgada a 5= gorda) y con más de dos lactancias. Las posibles fechas de parto se obtuvieron de las listas generadas por el programa informático de la AfiFarm' (Ltd., Kibbutz Afikim, Israel). Las vacas se seleccionaron teniendo en cuenta los registros de producción de leche de la lactancia anterior. El criterio de selección fue la producción promedio indicada en kilogramos de leche para 305 días de un año anterior.

El número de vacas consideradas en el estudio se obtuvo según los criterios de Fox *et al*<sup>(11)</sup> para el tamaño de la muestra, considerando la población total de vacas lecheras menos el 16.0 % correspondiente a las vacas en período seco y el 12.0 %, a aquellas vacas que tenían una sola lactancia. También se descartaron a aquellas a las que se diagnosticó mastitis, o bien, trastornos metabólicos o problemas respiratorios. Por último, se utilizaron 336 vacas en el muestreo. Los animales seleccionados fueron muestreados a 7 días antes, y 7 y 14 días después del parto (-7d, +7d y +14d).

Cada grupo de vacas lecheras (pre y post parto) se alimentó con la dieta respectiva. En cada dieta se utilizaron los mismos ingredientes. Se proporcionó a las vacas acceso a agua fresca a voluntad y se les alimentó con una dieta completa (DC) diaria que se diseñó para cumplir con los requerimientos nutricionales del ganado recomendados del NRC<sup>(12)</sup> para las vacas pre-parto y posparto. La dieta de preparto fue a base de heno de avena, harina de soya y maíz partido, y la dieta de las vacas posparto, a base de alfalfa y harina de soya (Cuadro 1).

**Cuadro 1:** Ingredientes y composición química de la ración mixta total suministrada a vacas Holstein-Friesian en condiciones de confinamiento antes y después del parto

Ingrediente	Dieta pre-parto, % <sup>1</sup>	Dieta posparto, % <sup>2</sup>
Heno de alfalfa	7.75	20.41
Frijol de soya	13.78	25.36
Semilla de algodón		6.82
Grano de destilería	4.68	1.47
Grano de sorgo, hojuelas		4.75
Grano de maíz, hojuelas		3.43
Pulpa de cítricos		12.76
Cáscaras de soya	10.62	1.51
Ensilado de maíz		3.40
Heno de avena	44.18	
Maíz quebrado	7.15	
Minerales	0.81	0.45

Melaza	9.24	12.76
Sales de calcio de ácidos grasos		5.98
Bicarbonato de sodio	0.05	0.05
Fosfato dicálcico	1.38	1.45
Premezcla vitamínica 1	0.36	0.30
Composición química		
Energía metabolizable, Mcal Kg <sup>-1</sup>	1.68	3.08
Energía neta de la lactancia, Mcal Kg <sup>-1</sup>	1.06	2.04
Proteína cruda, %	12.60	22.00
Fibra detergente ácida, %	21.70	18.00
Fibra detergente neutra, %	25.60	18.70

<sup>1</sup> El período pre-parto fue de la semana 3 a la semana 0 antes del parto. <sup>2</sup> El período de dieta posparto fue desde el parto hasta el día 60 de lactancia. <sup>3</sup> Las composiciones químicas se determinaron en el laboratorio siguiendo los procedimientos de la AOAC<sup>(31)</sup>, mientras que la FDN y la FDA se analizaron según los métodos de Goering y Van Soest<sup>(32)</sup>.

### Análisis del suero

En cada día de muestreo se recolectaron aproximadamente 10.0 ml de sangre de la vena o arteria coxígea en tubos al vacío sin anticoagulante (Beckton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) inmediatamente después del ordeño de la mañana y antes de la ingesta de alimento. Las muestras se mantuvieron bajo refrigeración y se permitió su coagulación. La sangre se centrifugó a 1,500 rpm durante 25 min; el suero se separó y almacenó a -20 °C en un período no superior a 6 h después de la recolección.

Las muestras para medir el BHBA y los NEFA se analizaron en los laboratorios de la Universidad Autónoma Nacional de México. Las concentraciones de NEFA en el suero sanguíneo se determinaron con un ensayo colorimétrico enzimático número 11 383 175 001, distribuido por los laboratorios Sigma Aldrich (Roche, Diagnostics, Mannheim, Alemania); mientras que el BHBA se analizó con un kit colorimétrico enzimático a través de un lector de placas. Este kit es distribuido por los laboratorios Stanbio (EKF Diagnostics-Stanbio, Boerne, TX, USA). Se utilizó un espectrofotómetro de absorción atómica (Analista 700, Perkin Elmer) para analizar las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> en el suero sanguíneo. Las concentraciones de calcio se determinaron siguiendo los procedimientos del fabricante<sup>(13)</sup>.

### Registro de enfermedades

El hato lechero se visitó diariamente. Los veterinarios registraban los eventos de las enfermedades después del ordeño matutino, utilizando una hoja de cálculo estándar, que se manejaba en el área de sistemas con el software AfiFarm (Ltd., Kibbutz Afikim, Israel). Las disfunciones metabólicas tales como la acidosis, la hipocalcemia, la cetosis y la cojera

se clasificaron como eventos clínicos. Los veterinarios normalizaron la información recopilada según los protocolos establecidos por la granja para la detección de enfermedades y trastornos. Las definiciones de las enfermedades ya han sido descritas anteriormente por LeBlanc *et al*<sup>(14)</sup>.

### Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software SAS<sup>(15)</sup>, con la vaca como unidad experimental. Las estadísticas descriptivas se obtuvieron con el procedimiento UNIVARIATE; se muestran en el Cuadro 2.

**Cuadro 2:** Umbral y estadísticas descriptivas de las muestras del experimento utilizado para evaluar la relación entre las concentraciones de metabolitos del suero sanguíneo y la producción de leche de las vacas Holstein-Friesian en confinamiento

Ítem	Umbral			Media	Desviación estándar
	Bajo	Medio	Alto		
Puntaje de la condición corporal (número de vacas)	≤ 2.25 (116)	2.25-3.50 (95)	≥ 3.50 (130)	3.55	0.18
Lactancia (número de vacas)	≤ 3.00 (104)	3.0-4.00 (108)	≥ 4.00 (124)	2.69	0.83
Producción de leche, kg vaca <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> , (número de vacas)	≤18.20 (122)	18.20-36.32 (123)	≥ 36.33 (91)	38.44	10.33

Las diferencias entre las concentraciones de BHBA, Ca<sup>2+</sup> y NEFA se analizaron usando PROC MIXED en un diseño completamente aleatorio para medidas repetidas. El modelo final es el indicado, tras eliminar las covariables y las interacciones dobles o triples que no fueron significativas ( $P \geq 0.05$ ).

$$Y_{ijk} = \mu + VACA_i + DÍA DE MUESTREO_j + VACA \times DÍA DE MUESTREO_{ij} + E_{ijk}$$

Donde:

$Y_{ijk}$  es una observación de las variables de respuesta;  $\mu$  es la media general;

$VACA_i$  es el efecto aleatorio de la  $i$ -ésima vaca ( $i = 1, 2, \dots, 336$ );

**DÍA DE MUESTREO** es el efecto del  $j$ -ésimo día de muestreo ( $j = -7, 7$  y  $14$ );

$VACA \times DÍA DE MUESTREO_{ij}$  es la interacción entre la vaca y el día de muestreo;

$E_{ijk}$  es el error aleatorio.

La estructura de covarianza para las concentraciones de BHBA y NEFA fue de simetría compuesta, mientras que la más apropiada para el  $\text{Ca}^{2+}$  fue autorregresiva de orden uno. Ambas se basaban en el criterio de información de Akaike más bajo.

Los niveles de BHBA,  $\text{Ca}^{2+}$  y NEFA en el suero sanguíneo fueron dicotomizados y evaluados individualmente en relación con el RL en los días 7 y 14 después del parto. Las variables ficticias RL y BCS se definieron siguiendo los procedimientos publicados por López-Ordaz *et al*<sup>(16)</sup>. Para el SCB, las vacas fueron clasificadas como moderadas (2.25 a 3.25) y gordas ( $\geq 3.5$ ). Las vacas con  $\text{SCB} > 3.5$  se clasificaron con el número uno y se consideraron como factor de riesgo. Estos valores se realizaron utilizando la frecuencia Proc de SAS.

Para cada metabolito y fecha de muestreo se establecieron por lo menos tres tipos de umbrales (bajo, medio y alto). Los umbrales se formaron siguiendo la metodología propuesta por Chapinal *et al*<sup>(9)</sup>. Para predecir el volumen de leche perdida o no cosechada, se utilizó la categorización de las vacas en grupos de riesgo bajo, medio y alto. Para estudiar la diferencia entre los umbrales se crearon variables Dummy jerárquicas; los valores categóricos fueron 1.0 y 0.0 para las vacas consideradas de alto y bajo riesgo, respectivamente, basándose en las concentraciones séricas de cada metabolito en cada día de muestreo de los umbrales utilizados. En la mayoría de los umbrales el nivel medio funcionó como punto de referencia.

Con los umbrales de alto riesgo definidos para BHBA,  $\text{Ca}^{2+}$  y NEFA, la proporción de vacas que estaban por encima y por debajo de los mismos umbrales para cada metabolito y para cada fecha de muestreo se determinó con la prueba de Chi cuadrado (Cuadro 3); mientras que las concentraciones en sangre de BHBA,  $\text{Ca}^{2+}$  y NEFA para los animales que estaban por encima o por debajo de los umbrales de alto riesgo se analizaron con Proc mezclado de SAS. Cuando las diferencias eran significativas entre las vacas, se utilizó la prueba de contrastes ortogonales para establecer la magnitud de las diferencias.

**Cuadro 3:** Estadísticas descriptivas de las muestras del experimento utilizado para evaluar la relación entre las concentraciones de metabolitos en el suero sanguíneo y la producción de leche

Ítem	Media (n=336)	Desviación estándar	Mínima	Máxima
BHBA, mmol L <sup>-1</sup>	0.73	0.45	0.20	3.84
$\text{Ca}^{2+}$ , mmol L <sup>-1</sup>	2.46	0.57	1.24	4.98
NEFA, mmol L <sup>-1</sup>	0.59	0.46	0.12	2.95

Para predecir el RL perdido o no cosechado, así como la posible relación entre los metabolitos y los trastornos metabólicos, se utilizó la clasificación de bajo, medio y alto; el RL se clasificó como bajo ( $\leq 18.20$ ), medio (18.21 a 36.33) y alto ( $\geq 36.33 \text{ kg d}^{-1}$ ) y se le denominó 0, -1 y 1, respectivamente, sobre la base de las variables discretas reportadas por López-Ordaz *et al*<sup>(16)</sup>.

Para cada umbral de concentración y día de muestreo se elaboraron modelos de regresión logística condicional multivariante (Proc Glimmix), utilizando una distribución binaria y una función de enlace logístico. Las variables de interés fueron las concentraciones de BHBA,  $\text{Ca}^{2+}$  y NEFA (las proporciones dicotomizadas de animales en el grupo de riesgo bajo, moderado o alto), la fecha de muestreo de interés y la fecha anterior (cuando el día -7 era la fecha de interés, se incluyó en el modelo el día 7 después del parto). También se incluyeron CC, PL y fecha de nacimiento; los resultados se presentan como índice de probabilidad e intervalos de confianza (IC = 95%) entre los animales por encima y por debajo del umbral de referencia. El índice de probabilidad expresa la ventaja o probabilidad de experimentar un evento (por ejemplo, pérdida o no recolección de leche) para un grupo de alto riesgo (por encima del umbral) en comparación con un grupo de bajo riesgo (por debajo del umbral).

## Resultados

El Cuadro 2 muestra los umbrales y el número de vacas para la evaluación del SCB, la lactancia y el RL de los animales utilizados en el estudio; mientras que el Cuadro 3 muestra el número de repeticiones, los valores medios y las desviaciones estándar de las concentraciones de metabolitos en el suero sanguíneo de los animales considerados en el estudio.

En el Cuadro 4 se indican las fechas de muestreo y la proporción de vacas que estaban por encima y por debajo de los umbrales. La proporción de vacas por encima de los umbrales para la BHBA en día -7 fue menor ( $P \leq 0.05$ ) que las observadas en los días 7 y 14. Por el contrario, no se observaron diferencias entre los días 7 y 14. La proporción de vacas por encima de los umbrales para el  $\text{Ca}^{2+}$  fue mayor ( $P \leq 0.001$ ) para los días -7 y 7 en comparación con el día 14. Sin embargo, para los NEFA, la proporción fue mayor ( $P \leq 0.001$ ) en el día 14 que los otros días (224 vs 108 y 30, para los días 7 y -7, respectivamente).



**Cuadro 4:** Vacas por encima o por debajo de los umbrales, y estadísticas descriptivas de las muestras del experimento utilizado para evaluar la relación entre las concentraciones de metabolitos en el suero sanguíneo

Ítem	n	Vacaciones por encima de los umbrales			EEM	P
		-7	7	14		
		BHBA $\leq$ 0.8 mmol L <sup>-1</sup>	336	9 <sup>a</sup>		
Calcio $\leq$ 2.3 mmol L <sup>-1</sup>	336	108 <sup>b</sup>	108 <sup>b</sup>	84 <sup>a</sup>	11.34	0.001
NEFA $\geq$ 0.5 mmol L <sup>-1</sup>	336	30 <sup>a</sup>	108 <sup>b</sup>	224 <sup>c</sup>	28.55	0.001
Vacaciones por debajo de los umbrales						
BHBA $\leq$ 0.8 mmol L <sup>-1</sup>	336	327	312	309	3.00	0.05
Calcio $\leq$ 2.3 mmol L <sup>-1</sup>	336	228 <sup>a</sup>	228 <sup>a</sup>	252 <sup>b</sup>	9.87	0.04
NEFA $\geq$ 0.5 mmol L <sup>-1</sup>	336	306 <sup>c</sup>	228 <sup>b</sup>	122 <sup>a</sup>	17.99	0.001

<sup>ab</sup> Letras diferentes en una misma fila indican diferencia estadística ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos.

La proporción de vacas por debajo de los umbrales de BHBA en los días 7 y 14 fue menor ( $P \leq 0,05$ ) que las observadas en el día -7. Por el contrario, no se observaron diferencias entre el día 7 y el día 14 (Cuadro 4). La proporción de vacas por debajo de los umbrales para el Ca<sup>2+</sup> fue mayor ( $P \leq 0.04$ ) que en los días -7 y 7 que en el día 14. Sin embargo, para los NEFA, la proporción fue mayor ( $P \leq 0.001$ ) en el día -7 que en los otros días (306 vs 228 y 122, para los días 7 y 14, respectivamente).

En el Cuadro 5 se muestran las concentraciones de metabolitos observadas en las vacas que estaban por encima y por debajo de los umbrales obtenidos para BHBA, Ca<sup>2+</sup> y NEFA, en los días -7, 7 y 14. En las vacas que estaban por encima de los umbrales, las concentraciones de BHBA en los días 7 y 14 fueron mayores ( $P \leq 0.02$ ) que las observadas en el día -7. Por el contrario, no hubo diferencia ( $P \geq 0.05$ ) entre las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> y NEFA de los días -7, 7 y 14 preparto.

**Cuadro 5:** Concentraciones de metabolitos, vacas por encima y por debajo de los umbrales, y estadísticas descriptivas de las muestras del experimento utilizado para evaluar la relación entre las concentraciones de metabolitos en el suero sanguíneo

Ítem	n	Vacas por encima de los umbrales			EEM	P
		-7	7	14		
BHBA $\leq$ 0.8 mmol L <sup>-1</sup>	336	1.04 <sup>a</sup>	1.65 <sup>b</sup>	1.68 <sup>b</sup>	0.12	0.05
Calcio $\leq$ 2.3 mmol L <sup>-1</sup>	336	108 <sup>b</sup>	108 <sup>b</sup>	84 <sup>a</sup>	11.34	0.001
NEFA $\geq$ 0.5 mmol L <sup>-1</sup>	336	30 <sup>a</sup>	108 <sup>b</sup>	224 <sup>c</sup>	28.55	0.001
Vacas por debajo de los umbrales						
BHBA $\leq$ 0.8 mmol L <sup>-1</sup>	336	0.49 <sup>a</sup>	0.71 <sup>b</sup>	0.66 <sup>b</sup>	0.06	0.02
Calcio $\leq$ 2.3 mmol L <sup>-1</sup>	336	1.93	1.85	1.88	0.05	0.02
NEFA $\geq$ 0.5 mmol L <sup>-1</sup>	336	0.20 <sup>a</sup>	0.42 <sup>b</sup>	0.41 <sup>b</sup>	0.05	0.01

<sup>ab</sup> Letras diferentes en una misma fila indican diferencia estadística ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos.

Con respecto a las vacas por debajo de los umbrales, las concentraciones de BHBA en los días 7 y 14 fueron diferentes ( $P \leq 0.02$ ) de las del día -7; por el contrario, no se observó ninguna diferencia ( $P \geq 0.02$ ) entre los días 7 y 14. Mientras que, para la misma fecha, las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> no fueron diferentes ( $P \geq 0.12$ ) en comparación con las otras dos fechas. Las concentraciones de NEFA del día 7 fueron diferentes ( $P \leq 0.01$ ) a la concentración en los días 7 y 14 postparto. Por el contrario, no se observó ninguna diferencia entre los días 7 y 14.

Con respecto a las vacas que se encuentran por debajo de los umbrales, las vacas del séptimo día después del parto mostraron un alto riesgo con concentraciones de NEFA en la sangre. La relación entre las concentraciones en sangre determinadas en el día 7 antes del parto y la incidencia de disfunciones metabólicas en los primeros 7 días de la lactancia tuvo un efecto significativo en la incidencia de la cojera ( $P \leq 0.01$ ), con un índice estimado de 7.6 [1.50 – 38.74; IC = 95%;  $P = 0.01$ ] veces más probabilidad de presentar este trastorno clínico cuando los NEFA son  $\geq 0.5$  mmol L<sup>-1</sup>. También se observó que en el 11 % de las vacas con altas concentraciones de HCBH se perdieron aproximadamente 0.37 kg de leche por vaca por día [Índice de probabilidad = 0.37; (0.14 a 1.01; IC = 95%;  $P = 0.05$ )].

## Discusión

Se sabe que los cuerpos cetónicos, de los cuales el BHBA es el principal, intervienen en la expresión de la cetosis, como depresores del CMS y afectan negativamente a la fertilidad de las vacas lecheras<sup>(17)</sup>. Se determinaron las concentraciones séricas de BHBA, Ca<sup>2+</sup> y NEFA 7 días antes del parto, y 7 y 14 días después del mismo, para establecer las relaciones entre esas concentraciones y las pérdidas de leche en las vacas Holstein-Friesian en confinamiento.

En el presente estudio, la baja proporción de vacas por encima de los umbrales de BHBA en el día -7 en comparación con los días 7 y 14 de la lactancia se explicó por las adaptaciones metabólicas y endocrinas de la vaca durante el período seco en ausencia de las necesidades de nutrientes para el RL; mientras que en la lactancia; el metabolismo de los nutrientes está relacionado con el balance energético negativo (BEN) causado por el RL y el consumo inadecuado de alimentos.

La adaptación necesaria se refleja en los cambios de varios parámetros sanguíneos. Como se ha señalado en otros estudios, la concentración de glucosa disminuye, mientras que las concentraciones de BHBA y NEFA aumentan, concomitantemente con los cambios relacionados en el sistema endocrino, principalmente la insulina y el glucagón<sup>(18)</sup>.

La diferencia en las concentraciones de BHBA antes y después del parto también se observó en otros estudios. Chapinal *et al*<sup>(9)</sup> en un gran estudio multirregional realizado en 55 establos, para validar las relaciones entre las concentraciones de BHBA con las enfermedades al comienzo de la lactancia, observaron que las vacas muestreadas en el día -7 estaban cuatro veces por debajo del umbral de riesgo de BHBA, en comparación con las muestreadas siete días después del parto. La diferencia se explicaba por el metabolismo de la energía en diferentes estados fisiológicos.

En el estudio de Chapinal *et al*<sup>(9)</sup> las concentraciones de BHBA fueron similares a las observadas aquí. En el presente estudio, las concentraciones séricas de BHBA encontradas fueron en promedio de 0.73, con una variación de 0.20 a 3.84 mmol L<sup>-1</sup>. Las concentraciones más altas se obtuvieron en los días 7 y 14 de la lactancia en comparación con las obtenidas en el día -7. El umbral a nivel de vaca de <0.8 mmol L<sup>-1</sup> utilizado en el presente estudio es similar a los sugeridos en otros trabajos<sup>(9-19)</sup>. Es concebible que la cetosis subclínica pueda comenzar a niveles de BHBA superiores a 1.0 mmol L<sup>-1</sup>; sin embargo, la decisión de establecer un umbral subclínico apropiado utilizando BHBA sérico o plasmático parece ser algo arbitraria.

Kelly<sup>(20)</sup> sugirió que se utilizara  $1.0 \text{ mmol L}^{-1}$  para separar las vacas con concentraciones bajas y altas de BHBA; mientras que Suthar *et al*<sup>(21)</sup> seleccionaron un umbral de cetosis subclínica de  $1.2 \text{ mmol L}^{-1}$  de BHBA. Dado que se considera que el aumento de los cuerpos cetónicos después del parto forma parte de una respuesta metabólica normal al aumento de la demanda de energía, parece que el punto de corte para definir las altas concentraciones de cuerpos cetónicos debería basarse tanto en la producción como en el deterioro de la salud.

Otros factores, como la edad de la vaca, también forman parte de la explicación de los altos niveles de BHBA en la lactancia temprana. En el presente estudio, las vacas con tres o más lactancias ( $2.5$  frente a  $3.6 \pm 1.5$ ) fueron más productivas que las vacas jóvenes, como consecuencia de lo cual una mayor proporción estaba por encima del umbral de riesgo (aproximadamente el 19 %). Las vacas mayores ( $> 4$  lactancias) consumen más alimento que las vacas más jóvenes, movilizan más glucosa y responden con mayores aumentos de BHBA debido a las necesidades de la lactancia<sup>(13)</sup>.

De acuerdo con estos criterios, en el presente estudio se consideraría que aproximadamente el 3, 7 y 8 % de las vacas tienen cetosis subclínica; porque sus concentraciones de BHBA eran superiores a  $1.0 \text{ mmol L}^{-1}$  para los días -7, 7 y 14, respectivamente. Puede ser una llamada de atención a la salud y a las posibles demandas de leche en el hato estudiado. En particular, el hato en estudio tiene los registros más productivos y reproductivos de la zona, lo que significa que otros hatos con parámetros más bajos podrían presentar cetosis subclínica en mayores proporciones en la zona de estudio. El calcio juega un papel fundamental en el RL, porque está involucrado en la transmisión de los impulsos nerviosos, la contracción de los músculos, la coagulación de la sangre, la actividad secretora de las células, la diferenciación celular, la respuesta inmune y la activación enzimática<sup>(22)</sup>.

En el presente estudio, la proporción de vacas por encima de los umbrales de  $\text{Ca}^{2+}$  fue menor en el día 14 que en los días 7 y -7; esto puede deberse a que la movilidad del  $\text{Ca}^{2+}$  durante el final de la gestación sólo tiene fluctuaciones muy leves porque los cambios en los requerimientos del mineral no son muy variables. Por el contrario, en los días posteriores al parto, las necesidades del metabolito aumentan drásticamente a medida que aumenta la síntesis de la leche producida. Según los NRC<sup>(11)</sup>, al comienzo de la lactancia, aproximadamente todas las vacas tienen un balance negativo de  $\text{Ca}^{2+}$ , por lo que a medida que la lactancia progresa y RL aumenta en volumen, como consecuencia la necesidad de mineral aumenta.

Van't Klooster<sup>(23)</sup> indicó que la absorción de  $\text{Ca}^{2+}$  aumentó un 22 % hacia el final de la preñez, llegando al 36 % para el día 8 de lactancia en las vacas que consumieron la dieta completa (DC). Lo que representó un aumento de aproximadamente 1.6 veces en la

absorción de  $\text{Ca}^{2+}$ . Después de ese período, los cambios fueron pequeños y en respuesta a los incrementos de la DC.

Chapinal *et al*<sup>(9)</sup> indicaron que tiende efectivamente a aumentar el  $\text{Ca}^{2+}$  a fin de cubrir la demanda del mineral para la síntesis de la leche. Este estudio incluyó 48 hatos, de los cuales el 33 % estaba por encima del umbral de riesgo cuando se determinó el  $\text{Ca}^{2+}$  en el día -7, en comparación con el 40 % de ellos que estaban por encima del mismo umbral cuando se determinó el  $\text{Ca}^{2+}$  en el día 7 después del parto.

En el presente estudio, las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en el suero fueron de aproximadamente  $2.46 \text{ mmol L}^{-1}$ , con un amplio rango de variación de  $1.24$  a  $4.98 \text{ mmol L}^{-1}$ . Como se ha indicado, el umbral de  $\text{Ca}^{2+}$  fue  $<2.3 \text{ mmol L}^{-1}$ , lo que sugiere que una elevada proporción de vacas corría el riesgo de presentar hipocalcemia subclínica (concentración sérica de  $\text{Ca}^{2+} <1.8 \text{ mmol L}^{-1}$ <sup>(24)</sup>); aunque los signos de fiebre láctea eran imperceptibles.

Como se ha indicado, el hato estudiado tiene los indicadores productivos más altos de la cuenca lechera, y aun así presenta un elevado número de vacas propensas a la hipocalcemia subclínica. La inferencia podría ser cierta para hatos con condiciones de manejo similares, en los que esa condición puede ser un problema que limita el RL. Otra parte de la explicación también tiene que ver con la edad de la vaca. Las vacas adultas con más de cuatro lactancias (aproximadamente el 19 %) fueron más propensas a la hipocalcemia y estaban por encima del umbral propuesto para el  $\text{Ca}^{2+}$ . En apoyo de lo anterior, Venjakob *et al*<sup>(25)</sup> observaron que las vacas primíparas con concentraciones séricas de  $\text{Ca}^{2+} < 2.0 \text{ mmol L}^{-1}$  no tenían ningún efecto sobre el RL, mientras que las vacas adultas no sólo presentaban hipocalcemia, sino que también producían menos leche ( $-2.19 \text{ kg animal}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) que las vacas libres de la enfermedad.

Neves *et al*<sup>(26)</sup> observaron que las vacas preparadas con concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  de  $\leq 2,4 \text{ mmol L}^{-1}$  tuvieron un mayor riesgo de ser clasificadas como hipocalcemia subclínica una semana antes del parto. Los autores indicaron que el umbral de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\leq 2,4 \text{ mmol L}^{-1}$ ) es necesario para identificar los animales en preparto con mayor probabilidad de presentar hipocalcemia subclínica. Aquellos estudios a nivel de hato que utilicen este punto de corte podrían establecer objetivos para medir el éxito de las estrategias preventivas.

Se requieren estudios adicionales para determinar los tiempos de muestreo de la sangre alrededor del parto y para evaluar la relación entre los ácidos grasos y el  $\text{Ca}^{2+}$  en el preparto. En las explotaciones lecheras modernas, el período periparto (aproximadamente 3 semanas antes y después del parto) presenta los mayores riesgos de desarrollar enfermedades y mortalidad en las vacas. Ferguson<sup>(27)</sup> sugirió que aproximadamente una de cada dos vacas sufre efectos adversos en su salud, y que aproximadamente el 75 % de las enfermedades se producen durante el período periparto<sup>(13)</sup>. Las enfermedades

metabólicas más comunes, como la hipocalcemia y la hipercetonemia, han demostrado que alteran el sistema inmunológico de la vaca, aumentan el riesgo de otras enfermedades y reducen el comportamiento productivo<sup>(17)</sup>.

En el presente estudio, aproximadamente 30 vacas estaban por encima de ese umbral de NEFA en el día -7, mientras que durante los días 7 y 14 de la lactancia el número de vacas aumentó de 108 a 224, respectivamente. El aumento de los niveles de NEFA en el período posparto podría explicarse por el aumento de las necesidades nutricionales debido a las necesidades particulares de la lactancia. Este efecto está relacionado con el hecho de que la mayoría de las vacas están en BEN y necesitan movilizar sus reservas corporales de lípidos para cubrir sus necesidades energéticas<sup>(11,28)</sup>.

A partir de un estudio con un mayor número de vacas y de lugares que éste, pero basado en los mismos umbrales de BHBA,  $\text{Ca}^{2+}$  y NEFA, Chapinal *et al*<sup>(9)</sup> concluyeron que aproximadamente el 11 % de los hatos estudiados estaban por encima del umbral de riesgo en el día -7, en comparación con el 23 % de los hatos en el séptimo día de lactancia. Los autores concluyeron que entre el 5 y el 50 % de los animales muestreados con niveles de NEFA por encima de los umbrales, tanto una semana antes como una semana después, estaban asociados a riesgos de desplazamiento del abomaso, pérdida de leche y reducción de la preñez en la primera inseminación.

En el presente estudio, los niveles de NEFA promediaron  $0.59 \text{ mmol L}^{-1}$  con un rango entre  $0.12$  y  $2.95 \text{ mmol L}^{-1}$ . Esto sugiere que las vacas del estudio estarían en riesgo de perder leche al comienzo de la lactancia, principalmente debido a alguna asociación con la hipocalcemia y la hipercetonemia debido a los niveles circulantes de NEFA.

Los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden con los de otros estudios. Ospina *et al*<sup>(19)</sup> encontraron que las concentraciones de NEFA  $> 0.3 \text{ mEq L}^{-1}$  del día 14 al 2 preparto, y NEFA  $> 0.6$ , y BHBA  $> 10 \text{ mg dL}^{-1}$  del día 3 a 14 posparto, tanto los valores preparto como posparto por encima de estos umbrales se asociaron con aumentos en la cetosis, la metritis, el desplazamiento abomasal y la retención de la placenta.

En el presente estudio, se buscó a través de la regresión logística condicional para relacionar las concentraciones de metabolitos con las disfunciones metabólicas alrededor del parto. Sin embargo, las asociaciones obtenidas no fueron significativamente importantes y debido a esto no fueron reportadas. Una observación única y significativa fue que a medida que aumentaban los NEFA en sangre ( $\geq 0.5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) había un incremento de hasta 7.6 veces [Índice de probabilidad = 7.61; (1.50 a 38.74; IC = 95%;  $P=0.01$ )] de las posibilidades de que se presentara laminitis; esto puede deberse a que la cojera produce fiebre y dolor en las pezuñas, lo que altera el comportamiento de descanso y alimentación de los animales<sup>(29,30)</sup>.

La fiebre reduce el apetito de la vaca, y el dolor en las pezuñas perjudica su capacidad de caminar y buscar alimento. La deficiencia de alimento aumenta la posibilidad de eliminar las reservas del cuerpo, aumentando los ácidos grasos libres. Los resultados del presente estudio fueron observados igualmente por otros. Collard *et al*<sup>(29)</sup> indicaron que las muestras de plasma con concentraciones de NEFA de 0.6 a 0.8 mmol L<sup>-1</sup> se asociaban con la presencia de cojera alrededor del parto en las vacas lecheras Holstein-Friesian alimentadas con DC.

Los resultados obtenidos en el presente estudio en relación con los niveles de NEFA y laminitis son contradictorios con otros estudios de la literatura. Calderón y Cook<sup>(30)</sup> informaron de que no había relación entre la cojera y los NEFA en las vacas Holstein-Friesian en torno al parto en una instalación comercial de estabulación libre sobre colchón. También observaron que las vacas cojas tuvieron tiempos de reposo más largos durante todo el período de transición y, en particular, durante tres días antes y después del parto. La cojera también se asoció con un mayor riesgo de cetosis en la granja de estudio, como lo demuestra la elevada concentración de BHBA encontrada en las vacas.

Los resultados obtenidos en el presente estudio ofrecen la oportunidad de examinar los efectos de las concentraciones pre y postparto de NEFA y BHBA en el RL a nivel de vaca. La identificación de estos niveles de preparto permitirá a los productores de leche mejorar sus estrategias de manejo nutricional, a fin de evitar pérdidas en el RL o la presencia de trastornos metabólicos como la laminitis. Los resultados obtenidos muestran también cómo el estado del metabolismo influye en la salud de la vaca durante el período de transición, lo que sugiere que la gestión nutricional debe revisarse cuidadosamente debido a su impacto en la lactancia posterior.

## **Conclusiones e implicaciones**

Un elevado porcentaje de vacas estuvo por encima de los umbrales de  $\beta$ -hidroxibutirato y ácidos grasos no esterificados, y la mayoría de ellas también presentó deficiencias de calcio una semana antes del parto. Las altas concentraciones de  $\beta$ -hidroxibutirato podrían promover pérdidas en el RL de hasta 0.37 kg vaca<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> siete días después del parto en vacas Holstein-Friesian. Los altos niveles de grasa no esterificada se asociaron con un riesgo 7.6 veces mayor de laminitis. Los umbrales de riesgo para cada metabolito no se asociaron con la cantidad de leche perdida 14 días después del parto en las vacas Holstein-Friesian.



## Agradecimientos

Los autores agradecen a Biotecap, especialmente al Ing. Juan de Dios y al Dr. Adelfo Vite, por proporcionar las instalaciones para la realización de la fase de campo de este estudio. Los agradecimientos se extienden al Dr. Agustín Garza por facilitar los animales utilizados en el experimento. También se agradece al CONACYT por proveer los fondos para que la segunda autora cursara sus estudios de Maestría en Ciencias.

### Literatura citada:

1. Gross J, van Dorland HA, Bruckmaier RM, Schwarz FJ. Performance a metabolic profile energy balance with subsequent re-alimentation. *J Dairy Sci* 2011;94:1820–1830, doi: 10.3168/jds.2010-3707.
2. Veech RL, Chance B, Kashiwaya Y, Lardy HA, Cahill GF. Ketone bodies, potential therapeutic uses. *Inter Union Biochem Mol Biol* 2001;51:241-247, doi:10.1080/152165401753311780.
3. Ruderman NB, Goodman MN. Regulation of ketone body metabolism in skeletal muscle. *Amer J Phys* 1973;224:1391-1397. doi: 10.1152/ajplegacy.1973.224.6.1391.4.
4. Ospina PA, Nydam DV, Stokol T, Overton, TR. Associations of elevated non-esterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the northeastern of Unites States. *J Dairy Sci* 2010;93:1596–1603. doi:10.3168/jds.2009-2852.
5. Schlumbohm C, Harmeyer J. Hyperketonemia impairs glucose metabolism in pregnant and nonpregnant ewes. *J Dairy Sci* 2004;87:350-358. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73174-4.
6. Duffield T, Lissemore K, McBride M, Leslie K. Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *J Dairy Sci* 2009;92:571-580. doi: 10.3168/jds.2008-1507.
7. Horst RL, Goff JP, Reinhardt TA. Calcium and vitamin D metabolism in the dairy cow. *J Dairy Sci* 1994;77:1936–1951. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(94)77140X.
8. Seifi HA, LeBlanc SJ, Leslie KE, Duffield TF. Metabolic predictors of postpartum disease and culling risk in dairy cattle. *Vet J* 2011; 188:216220. doi: 10.1016/j.tvjl.2010.04.007.
9. Chapinal N, LeBlanc S, Carson M, Leslie K, Godden S, Capel M, Duffield T. Herd-level association of serum metabolites in the transition period with disease, milk



- production, and early-lactation reproductive performance. *J Dairy Sci* 2012;95:1301-1309. doi:10.3168/jds.2011-4724.
10. García E. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía. 5ta. ed. México: UNAM; 2005.
  11. Fox N, Hunn A, Mathers N. Sampling and sample size calculation. The National Institute for Health Research. USA: NHR RDs eM/YH; 2009.
  12. NRC. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th revised ed. National Academy of Sciences, Washington, DC USA: National Academy Press; 2001.
  13. Perkin Elmer. Perkin Elmer Corporation. Analytical methods for atomic absorption. Associations of Official Analytical chemists. 2000. Norwalk, Connecticut; 1996.
  14. LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, Ten-Hag 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. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74209-4.
  15. SAS. SAS User's Guide: Statistics (Version 9.1.3). SAS Inst. Inc. Cary, NC, USA; 2012.
  16. López-Ordaz R, Tinajero, PT, López OR, Mendoza G, Roldan MJ, Vite A, Ruiz FA. Relaciones entre calcio, ácidos grasos no esterificados, e insulina sanguínea en parto y leche bovina perdida en el inicio de la lactancia. *Nova Scientia* 2017;9(19):306-328. doi:10.21640/ns.v9i19.1053.
  17. Raboisson D, Mounie M, Maigne M. Disease, reproductive performance, and changes in milk production associated with subclinical ketosis in dairy cows: A meta-analysis and review. *J Dairy Sci* 2015;97:7457–7563. doi: 10.3168/jds.2014-8237.
  18. Bruckmaier RM, Gross JJ. Lactational changes in transition dairy cows. *Anim Prod Sci* 2017; 57:1471-1483. doi.org/10.1071/ANI1657.
  19. Ospina PA, Nydam DV, Stokol T, Overton TR. Association between the proportions of sampled transition cows with increased nonesterified fatty acids and betahydroxybutyrate and disease incidence, pregnancy rate, and milk production at the herd level. *J Dairy Sci* 2010;93:3595–3601. doi: 10.3168/jds.2010-3074.
  20. Kelly JM. Changes in serum B hydroxybutyrate concentrations in dairy cows kept under commercial farm conditions. *Vet Rec* 1977;101:499–502.
  21. Suthar VS, Canelas-Raposo J, Deniz A, Heuwieser W. Prevalence of subclinical ketosis and relationships with postpartum diseases in European dairy cows. *J Dairy Sci* 2013;96:2925–2938. doi: 10.3168/jds.2012-6035.

22. Mori M, Rossi S, Bonferoni MC, Ferrari F, Giuseppina S, Riva F, Del Fant C, Perotti C, Caramella C. Calcium alginate particles for the combined delivery of platelet lysate and vancomycin hydrochloride in chronic skin ulcers. *Int J Pharmacol* 2014;461:505-513. doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.12.020.
23. van't Klooster AT. Adaptation of calcium absorption from the small intestine of dairy cows' changes in the dietary calcium intake and at the onset of lactation. *Zeitschrift fuer Thierphysiology* 1976;37:169-182.
24. Duffield TF, Lissemore KD, McBride BW, Leslie KE. Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cow on health and production. *J Dairy Sci* 2005;92:571-580. doi:10.3168/jds.2008-1507.
25. Venjakob PL, Paiper L, Heuwieser W, Borchardt S. Association of postpartum hypocalcemia with early-lactation milk yield, reproductive performance, and culling in dairy cows. *J Dairy Sci* 2018;101:1-10. doi:10.3168/jds.2016-11714.
26. Neves RC, Leno BM, Curler MD, Thomas MJ, Overton TR, McArt JAA. Association diseases, culling, reproduction, and milk production in Holstein cows. *J Dairy Sci* 2017;100:547-5. doi:10.3168/jds.2017-13313.
27. Ferguson JD. Nutrition and reproduction in dairy herds. *Vet Clin N Am Food Anim Pract* 2005;21:325-333.
28. Bernabucci UL, Basiricó P, Morera D, Dipasquale A, Vitali F, Piccioli C, Calamari L. Effect of summer season on milk protein fractions in Holstein cow. *J Dairy Sci* 2015;98:1815-1827. doi: 10.3168/jds.2014-8788.
29. Collard BL, Boettcher PJ, Dekkers JCM, Petitclerc D, Schaeffer LR. Relationships between energy balance and health traits of dairy cattle in early lactation. *J Dairy Sci* 2000;83:2683-2690. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(00)75162-9.
30. Calderon DF, Cook NB. The effect of lameness on the resting behavior and metabolic status of dairy cattle during the transition period in a free stall-housed dairy herd. *J Dairy Sci* 2011;94:2883-2894. doi:10.3168/jds.2010-3855.
31. AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 18th. ed. Association of Official Analytical Chemists Press. Gaithersburg, MD. AOAC International. 2006.
32. Goering HK, Van Soest PJ. Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications) Agricultural handbook no. 379. ARS-USDA, Washington, DC, USA. ARS-USDA Press Inc. 1970.