



MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

**RELACIÓN ENTRE EL β -HIDROXIBUTIRATO
SANGUÍNEO Y LA PRODUCCIÓN DE GRASA Y
PROTEÍNA DE LECHE**

T E S I S

(Idónea Comunicación de Resultados)

Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Agropecuarias

P R E S E N T A

MVZ. Arturo César García Casillas

COMITÉ TUTORAL:

Director:

Dr. Lisandro Atílio Montiel Ramos

Asesor Interno:

Dr. Fernando Borderas Tordesillas

Asesor Externo:

Dr. Vincent Girard

México, D.F. Septiembre del 2012

ÍNDICE DE CONTENIDO (CON HIPERVÍNCULOS) ⁽¹⁾	PÁGS.
AGRADECIMIENTOS	7
Título	8
Comité Tutoral	8
I. INTRODUCCIÓN	9
II. MARCO DE REFERENCIA	11
II. 1. La producción internacional de leche	11
II. 2. El comercio de leche en el mundo	13
II. 3. La producción nacional de leche	16
II. 4. Desafíos para el desarrollo competitivo del sector lechero mexicano	19
III. MARCO TEÓRICO	24
III. 1. La gluconeogénesis hepática	24
III. 1. 1. La desaminación oxidativa de aminoácidos	25
III. 1. 2. La oxidación y la β -oxidación de lípidos	27
III. 1. 3. Lipoproteínas de muy baja densidad	32
III. 2. El período de transición del ganado lechero	35
III. 2. 1. Adaptaciones metabólicas	35
III. 2. 2. Adaptaciones endocrinas durante el período de transición	37
III. 2. 3. El balance energético negativo	40
III. 3. Recomendaciones para la etapa de transición	42
III. 3. 1. Evaluación del estado corporal	42
III. 3. 2. Relación forraje: concentrado de la ración pre y posparto	44
III. 4. El diagnóstico de la cetosis	46
III. 4. 1. Química seca	47
III. 4. 2. Perfil metabólico sanguíneo	49

⁽¹⁾ cómo utilizar hipervínculos.

a) seleccionar con el puntero el capítulo, sub capítulo, figura o cuadro que se desee conocer.

b) presionar la tecla Ctrl + clic sobre la selección para seguir el hipervínculo y desplazarse automáticamente a la parte del texto seleccionada



III. 4. 3. Relación grasa: proteína como indicador de cetosis subclínica	52
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	54
V. OBJETIVOS	54
V. 1. General	54
V. 2. Particulares	54
VI. HIPÓTESIS	54
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	55
VII. 1. Trabajo de campo	55
VII. 1. 1. Colecta de las muestras de leche	55
VII. 1. 2. Colecta de las muestras de sangre	55
VII. 2. Trabajo de laboratorio	56
VII. 2. 1. Espectrofotometría en el infrarrojo por transformada de Fourier (FTIV)	56
VII. 2. 2. Método enzimático NAD ⁺ dependiente	60
VII. 3. Trabajo de gabinete	61
VIII. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	67
IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	68
X. CONCLUSIÓN	78
XI. PROSPECCIÓN	79
XII. APÉNDICE	80
Anexo 1. Editor SAS para monitoreo de β -hidroxibutirato sanguíneo mediante regresión lineal	80
Anexo 2. Editor SAS para predicción de cetosis subclínica mediante regresión logística	82
XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83



Cuadro 1. Panorama del mercado mundial para la producción de leche, período 2009-2011 (millones de toneladas equivalente leche) 12

Cuadro 2. Principales exportadores de leche entera y desnatada en polvo, período 2006-2010 (miles de toneladas) 15

Cuadro 3. Origen de las importaciones mexicanas de leche y productos lácteos, año 2011 18

Cuadro 4. Importaciones de leche en polvo provenientes de Estados Unidos, período 2010-2011 (toneladas) 20

Cuadro 5. Valores óptimos de condición corporal 42

Cuadro 6. Interpretación de la concentración de β -hidroxibutirato en leche 48

Cuadro 7. Interpretación de la concentración de acetoacetato en orina 49

Cuadro 8. Interpretación de la concentración de acetoacetato en leche 49

Cuadro 9. Valores normales de sólidos en leche 53

Cuadro 10. Materiales suministrados en el Kit art. 1007, RANDOX 60

Cuadro 11. Características de los hatos en estudio, n = 59 hatos 68

Cuadro 12. Ecuaciones de regresión lineal que describen la variación en el ln del β -hidroxibutirato durante la lactancia temprana, n = 59 hatos 70

Cuadro 13. Valores previstos: modelo lineal β -hidroxibutirato = relación grasa: proteína, 73

Cuadro 14. Estimador de máxima verosimilitud (β^f), *odds ratio* [Exp (β^f)], Max re-escalado R^2 (MRR2), sensibilidad, especificidad, falsos positivos (F^+) y falsos negativos (F^-) de cetosis subclínica a través de su asociación con la relación grasa: proteína de leche en 10 diferentes puntos de corte de β -hidroxibutirato sanguíneo, n = 59 hatos 74

Cuadro 15. Sensibilidad y especificidad del modelo relación grasa: proteína y pruebas comerciales para detección de cetosis 76



Figura 1. Precios internacionales de leche en polvo, período 2005-2009 (dólares por tonelada) 13

Figura 2. Estadísticas de la producción de leche de vaca en México, período 2000-2012 (millones de litros) 16

Figura 3. Producción, importación y consumo de leche, año 2011 18

Figura 4. Comportamiento y pronóstico del precio (sorgo y maíz amarillo), período 2006-2018 (US\$ por tonelada) 19

Figura 5. Ubicación de los centros de acopio y enfriamiento de leche fresca de LICONSA año 2010 21

Figura 6. Evolución de la compra en el mercado internacional de LICONSA, período 2001-2010 (miles de toneladas) 22

Figura 7. Evolución de la compra en el mercado nacional de LICONSA, período 2001-2010 (millones de litros) 22

Figura 8. Comparativo de precios promedio al consumidor y al productor de leche fluida, período 2009 23

Figura 9. Relación entre aminoácidos y carbohidratos 26

Figura 10. Triacilglicerol: tres moléculas de ácidos grasos de igual o diferente tamaño de cadena, grado de saturación/insaturación e isomería, esterificados con una molécula de glicerol 27

Figura 11. Metabolismo hepático de los lípidos 28

Figura 12. Cuerpos cetónicos: acetoacetato (AcAc), acetona (Ac) y β-hidroxibutirato (βHBA) 30

Figura 13. Cetogénesis 30

Figura 14. Metabolismo de los cuerpos cetónicos 31

Figura 15. Metabolismo hepático de los ácidos grasos 33

Figura 16. Estructura de lipoproteínas de muy baja densidad 34

Figura 17. Balance energético negativo, curva de lactancia, curva de ingestión y recría 41

Figura 18. Región infrarroja del espectro electromagnético cubierta por MilkoScan 56

Figura 19. Principio técnico del espectrofotómetro de absorción de luz infrarroja 57



Figura 20. Principio óptico del sistema de medición del espectrofotómetro contenido dentro del MilkoScan™ FT+	58
Figura 21. Filtros del MilkoScan™ FT+ para grasa	59
Figura 22. Filtro del MilkoScan™ FT+ para proteína	59
Figura 23. Oxidación de β -hidroxibutirato a acetoacetato por acción de la enzima β -hidroxibutirato deshidrogenasa	61
Figura 24. Modificación en la densidad de la elipse: Macro Outlier, distancia robusta de Mahalanobis	63
Figura 25. Cronograma de actividades	67
Figura 26. Relación entre el ln del β -hidroxibutirato y la relación grasa: proteína de leche. ln del β -hidroxibutirato (●); respuesta pronosticada (—)	70
Figura 27. Normalidad de los residuales: modelo lineal ln del β -hidroxibutirato = relación grasa: proteína de leche	71
Figura 28. Homocedasticidad: modelo lineal residuales = previstos. Residuales (●); respuesta pronosticada (—)	71
Figura 29. Predicción de la probabilidad de cetosis subclínica a través de su asociación con la relación grasa: proteína de leche. Intervalo de confianza del 95 %; punto de corte de 0.93 mM de β -hidroxibutirato sanguíneo; valores observados (○), respuesta pronosticada (—)	75
Figura 30. Curva ROC: modelo logístico ausencia y presencia de cetosis subclínica = relación grasa: proteína de leche. Respuesta pronosticada (—)	77
Figura 31. Alteración del estado ácido: base. ^{A)} Balance energético positivo; ^{B)} Balance energético negativo.	79



AGRADECIMIENTOS

Durante estos años son muchas las personas e instituciones que han participado en este proyecto de investigación y a quienes quiero expresar mi gratitud por el apoyo y la confianza que me han prestado.

Agradezco el apoyo y los medios recibidos por parte de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Me complace agradecer al Dr. Lisandro Atilio Montiel Ramos por haber confiado en mi persona y por haberme proporcionado una amistad desde que lo conocí hasta la fecha, orientándome por el camino del conocimiento.

Mi gratitud al Dr. Fernando Borderas Tordesillas y al Dr. Vincent Girard por sus consejos, el ánimo que me brindaron y por sus conocimientos estadísticos que llevo conmigo.

Un sincero agradecimiento a la Dra. María Guadalupe Micaela Prado Flores por su siempre desinteresada colaboración y participación, aportándome su claridad conceptual y sus atinadas sugerencias y/o correcciones, logrando contagiarme su pasión por la bioquímica.

Agradezco a la Lic. en Psicología Claudia Tirado Torres mi compañera y confidente, todo esto nunca hubiera sido posible sin su amparo incondicional.

No puedo olvidar agradecer a mi madre que me acompañó en esta aventura que significó la maestría y que de forma incondicional, entendió mis ausencias y mis malos momentos y a mi padre, que a pesar de la distancia siempre estuvo atento para saber cómo iba mi proceso.

Gracias a todos



Título

Relación entre el β -hidroxibutirato sanguíneo y la producción de grasa y proteína de leche

Comité Tutoral

Director: Dr. Lisandro Atilio Montiel Ramos, adscrito al Departamento de Producción Agrícola y Animal en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Dirección: Edificio A 3er Piso, División de Ciencias Biológicas y de la Salud; Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco Calzada del Hueso 1100 Col. Villa Quietud Delegación Coyoacán C. P. 04960 México D.F. Experto en Bioquímica y Nutrición Animal.

Asesor Interno: Dr. Fernando Borderas Tordesillas, adscrito al Departamento de Producción Agrícola y Animal en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Dirección: Edificio A 3er Piso, División de Ciencias Biológicas y de la Salud; Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco Calzada del Hueso 1100 Col. Villa Quietud Delegación Coyoacán C. P. 04960 México D.F. Experto en Etología y Bienestar Animal.

Asesor Externo: Dr. Vincent Girard, adscrito al Departamento de Biomedicina Veterinaria en la Universidad de Montreal. Dirección 3200, Sicotte Saint-Hyacinthe (Québec Canadá) J2S 2M2. Pabellón de Biomedicina - 3200 Sicotte, local 3990. Experto en Bioquímica y Nutrición Animal.



I. INTRODUCCIÓN

En 10 años la producción de leche de vaca en México creció alrededor de 1,401 millones de litros, pasando de 9,311 en el año 2000 a 10,712 para el 2010. Durante el año 2011 la producción fue de 10,743 millones de litros; sin embargo, esta cantidad sólo abasteció al 68.72 % del consumo total nacional; por lo que fue necesario importar 618,439 toneladas de materias primas y productos terminados (CANILEC, 2012; SIAP-SAGARPA, 2012). Para competir con el alza de precios en el mercado de lácteos a nivel nacional e internacional, México requiere desarrollar empresas lácteas con elevados niveles productivos; sin embargo, cuanto más alto sea el potencial productivo del hato, mayor será el riesgo de provocar trastornos metabólicos en las vacas (Ospina *et al.*, 2010b; a).

La selección genética que ha venido realizando el hombre a través del tiempo para aumentar la producción de leche, ha incrementado la diferencia entre el gasto energético y la disponibilidad de energía, especialmente durante la lactancia temprana, ocasionando un aumento en la tendencia fisiológica de la vaca para responder a las deficiencias energéticas con el catabolismo y la utilización de sus tejidos corporales (Friggens *et al.*, 2007). Estas adaptaciones metabólicas conllevan una alteración de la relación grasa: proteína en leche, debido a una disminución en la producción de proteína láctea a causa de una reducción en el suministro de energía y un incremento en la producción de grasa láctea, ocasionado por la mayor disponibilidad de β -hidroxibutirato y ácidos grasos libres, producidos por el catabolismo de los lípidos corporales (Gantner *et al.*, 2009; Butchereit *et al.*, 2010).

La elevación del β -hidroxibutirato sanguíneo durante la lactancia temprana genera cetosis subclínica en las vacas; al respecto Duffield *et al.* (2009) estimaron una pérdida económica de US\$ 78 por vaca con cetosis subclínica incluyendo tratamiento, disminución en la producción láctea: 1.4, 1.8, 3.2 y 4.2 kg de leche, al alcanzar una concentración en suero de 1400, 1600, 1800 y 2000 μM de β -hidroxibutirato respectivamente, aumento del riesgo de desplazamiento de abomaso y aumento en los días abiertos al retrasar la concepción en dos semanas, por alteración del ciclo ovárico de los animales. Asimismo, indicaron que el 40 % de las vacas lecheras se ven afectadas por la cetosis subclínica al menos una vez durante la lactancia.



En la actualidad ha tomado relevancia para los médicos veterinarios zootecnistas, productores y consultores de nutrición animal, la obtención de información relativa a la nutrición y el estado metabólico del hato sobre el diagnóstico de problemas específicos de cada animal, buscando la creación de herramientas que permitan monitorear la salud del hato, ayudando a estimar patologías metabólicas y de producción (van Saun, 2006). Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue evaluar a través de un estudio transversal durante la lactancia temprana, si el β -hidroxibutirato sanguíneo se relaciona con la grasa y proteína de leche, de manera tal que permita generar modelos discriminatorios para monitorear el β -hidroxibutirato sanguíneo y estimar la presencia de cetosis subclínica no como una prueba de diagnóstico individual, sino como una herramienta para el diagnóstico del hato.

II. MARCO DE REFERENCIA

II. 1. La producción internacional de leche

En el año 2011 la población mundial fue de 7 mil millones de personas, registrándose un nacimiento de 210,000 personas/día y se espera que para el año 2100 la población mundial presente un incremento del 30 %, llegando a 10 mil millones de personas (ONU-UNFPA, 2012). Este incremento demográfico se verá acompañado de un crecimiento económico, que se traducirá en un aumento significativo en la demanda de productos lácteos en los próximos años. Este aumento en la demanda, será significativamente mayor en los países en desarrollo, donde se espera que el incremento sea de un 103 % en comparación con los países desarrollados en donde el incremento se espera de sólo 7 % (FAO, 2012).

Durante los años 2008 y 2009 el mercado mundial de leche y derivados lácteos experimentó los efectos de la crisis económica internacional y una relación ajustada entre los precios de lácteos y los precios de los granos. La producción mundial de leche fluida para el año 2010 alcanzó las 512.7 millones de toneladas, cifra 1.5 % superior a lo alcanzado en el año 2009; sin embargo, sigue estando por debajo del crecimiento medio anual del 2.1 % experimentado por el sector en la década pasada. Alrededor del 58 % del crecimiento de la producción mundial de leche fluida se explica por la producción adicional de China y la India (FIRA, 2011).

La producción mundial de leche fluida es generada en un 66.8 % por la Unión Europea, la India y Estados Unidos. Para el caso de la India, durante el año 2010 la oferta de leche creció en 4.5 % al alcanzar 117 millones de toneladas. En este país, en los últimos años se ha implementado un programa de mejoramiento genético y capacitación para los productores, con la finalidad de mejorar los rendimientos del hato lechero. En la India predominan las razas criollas con rendimientos anuales de 1.1 toneladas por vaca, cifra por debajo del promedio mundial de 3.5 toneladas por vaca. Sin embargo, sus costos de producción son relativamente más bajos que los observados en otros países que alimentan al ganado a base de granos (FIRA, 2011).



Para el año 2009 la producción mundial llegó a 698.5 millones de toneladas equivalente leche y para el año 2010 la producción aumentó a 710 millones de toneladas equivalente leche, con un consumo humano *per capita* mundial de 101.3 y 101.8 kg/año respectivamente (Cuadro 1). Se estimó que para el año 2011 la producción mundial de leche debió alcanzar las 723.8 millones de toneladas equivalente leche, es decir un incremento de 1.9 % respecto del año 2010 (FIRA, 2011; FAO, 2012).

Cuadro 1. Panorama del mercado mundial para la producción de leche, período 2009-2011
(millones de toneladas equivalente leche)

	Años			
	2009	2010	2011	Variación de 2010 a 2011
	Millones de toneladas equiv. leche ⁽¹⁾			%
Balanza mundial				
Producción total de leche	698.5	710.0	723.8	1.9
Comercio total	44.0	46.0	48.3	4.5
Indicadores de la oferta y la demanda				
Consumo humano <i>per capita</i>:				
Mundial (kg/año)	101.3	101.8	102.6	0.8
Países desarrollados (kg/año)	235.7	235.0	235.2	0.1
Países en desarrollo (kg/año)	65.7	66.9	68.2	1.9

Fuente: (FAO, 2012).

⁽¹⁾ equivalente leche: es el promedio ponderado, calculado sobre una base de grasa de leche y una base de sólidos en leche sin grasa, con factores de conversión equivalente a

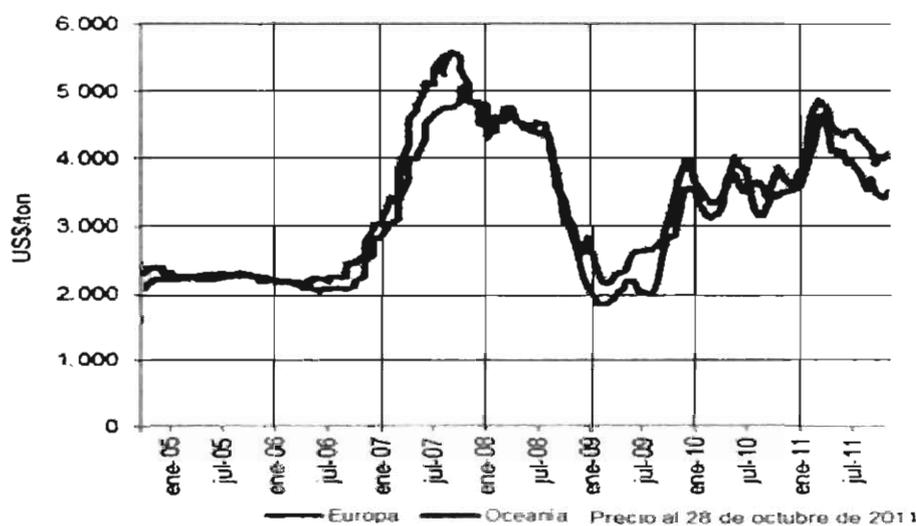
- 1000 mL. * 11.8 % de sólidos totales para la leche entera.
- 1000 mL. * 8.5 % de sólidos no grasos para la leche descremada.
- 1000 mL. * 6.5 % de sólidos de leche para el suero de leche
- 1000 mL. * 3.5 % de sólidos de leche para la crema.

En el año 2010 el inventario mundial se ubicó en 130.4 millones de vacas. La India poseyó el 33.4 % de las vacas de ganado lechero global y mostró una clara tendencia a la alza, es decir, entre los años 2005 y 2010 el inventario ganadero de la India creció a una tasa media anual de 2.8 %. En tanto, la Unión Europea participó con el 18.1 % del hato lechero mundial. En el caso de esta región las existencias de ganado lechero expresaron una tendencia a la baja. Entre los

años 2005 y 2010 la tasa media anual de decremento fue de 1.4 %. Por su parte Estados Unidos tuvo el 7 % del hato lechero mundial en los años 2005 y 2010 y su inventario ganadero ha mostrado un crecimiento marginal de 0.1 % (FIRA, 2011; FAO, 2012).

II. 2. El comercio de leche en el mundo

Dada la importancia de la leche en polvo como insumo para la industria, se sitúa como referente para los precios internacionales, los cuales comenzaron a mostrar una severa variación: durante el año 2005 el precio fue de US\$ 2,500 por tonelada, el precio más alto se logró en agosto del año 2007 cuando se alcanzó los US\$ 5,600 por tonelada (Figura 1), como resultado de la disminución significativa de la oferta, asociada al incremento en el precio de cereales secundarios y la drástica reducción de existencias públicas en la Unión Europea. Posteriormente, debido al aumento en la disponibilidad de productos lácteos en el mercado internacional, la crisis económica por la revaluación del dólar en muchos países, la contaminación con melamina de los suministros de leche en China y al aumento en la producción de Nueva Zelanda, se alcanzó en el año 2009 el precio más bajo de US\$ 1,900 (FIRA, 2011; FAO, 2012).



Fuente: (FIRA, 2011, FAO, 2012).

Figura 1. Precios internacionales de leche en polvo, periodo 2005-2011 (dólares por tonelada)



El índice de la FAO para los precios de los productos lácteos internacionales se fortaleció durante el primer trimestre del año 2011, la caseína, la leche desnatada en polvo (LDP) y la leche entera en polvo (LEP) registraron aumentos del 9 % en todos los casos situándose en US\$ 8,672, US\$ 3,807 y US\$ 4,075 por tonelada, respectivamente (FAO, 2012).

Durante los años 2010 y 2011 las reservas de los principales países exportadores que definen la demanda de los productos lácteos a nivel mundial, disminuyeron para satisfacer la creciente demanda de importaciones por lo que la disponibilidad de suministros para el comercio en el año 2012, depende cada vez más de los resultados de la producción. Como resultado, las cotizaciones internacionales de los productos lácteos serán particularmente sensibles a las condiciones climáticas imperantes durante el resto del año, por sus consecuencias tanto para el crecimiento de los pastizales como para la disponibilidad y el precio de los forrajes y cereales secundarios. Ante este escenario, la estrategia de los principales países productores para permanecer en forma competitiva en el mercado es el incremento de la productividad por unidad animal y en algunos casos, la reducción gradual del inventario ganadero (p. ej., Unión Europea y Rusia) (FIRA, 2011).

En el caso de las exportaciones para leche en polvo, en el promedio entre los años 2006-2008 se exportaron 3,179 miles de toneladas a nivel global, de las cuales 1,953 miles de toneladas correspondían a leche entera en polvo y 1,226 miles de toneladas a leche desnatada en polvo (Cuadro 2). El 83.9 % de las exportaciones las realizaron quince países, Nueva Zelanda participó con el 25.8 % del total de las exportaciones globales. Para finales del año 2007, los mayores precios internacionales impulsaron la producción estadounidense, pero sobre todo disminuyó el consumo de leche entera en polvo para alimentación animal, con lo que Estados Unidos aumentó de octubre del año 2007 a febrero del año 2008 sus exportaciones de leche entera en polvo, generando un ajuste a la baja en el precio internacional (FAO-GIEWS, 2010; FIRA, 2011).

Para el año 2010 se exportaron 3,681 miles de toneladas de leche en polvo, de las cuales 2,082 miles de toneladas correspondían a leche entera en polvo (Cuadro 2) y 1,599 miles de toneladas a leche desnatada en polvo (FAO, 2012).

Cuadro 2. Principales exportadores de leche entera y desnatada en polvo, período 2006-2010

(miles de toneladas)

	Años		
	2006-2008	2009	2010
Miles de toneladas			
Leche entera en polvo⁽¹⁾			
Mundo	1,953	2,019	2,082
Nueva Zelanda	701	860	885
Unión Europea	434	440	440
Australia	130	115	120
Argentina	117	159	187
Leche desnatada en polvo⁽²⁾			
Mundo	1,226	1,476	1,599
Nueva Zelanda	310	355	380
Estados Unidos	300	358	376
Unión Europea	203	378	428
Australia	142	132	136

Fuente: (FAO, 2012).

⁽¹⁾ leche entera en polvo (LEP) contenido de materia grasa de la leche entre 26 y 42 %, contenido máximo de agua 5 %, contenido mínimo de proteínas 34 % (CODEX, 1999)

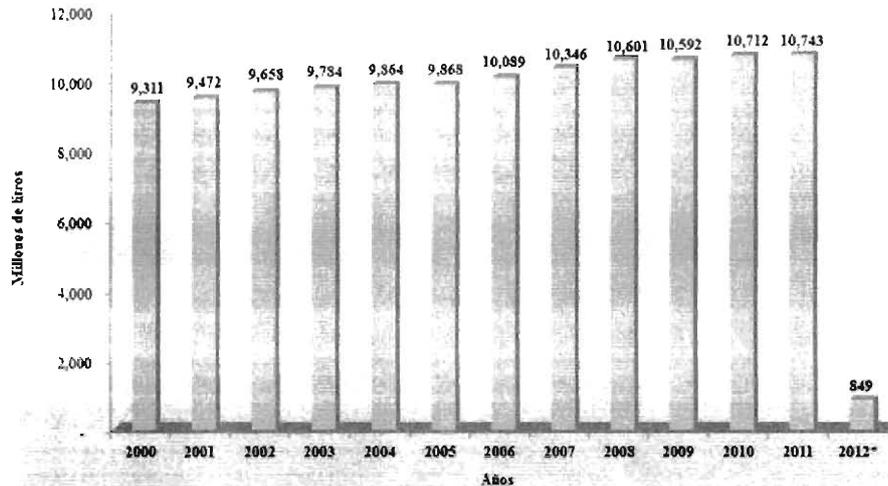
⁽²⁾ leche desnatada en polvo (LDP): contenido máximo de materia grasa de la leche 1.5 %, contenido máximo de agua 5 %, contenido mínimo de proteínas 34 % (CODEX, 1999)

Aunque la Unión Europea sigue siendo el segundo proveedor mundial de leche entera en polvo a una gran distancia de Nueva Zelanda, sus suministros limitados pronosticaron el mismo nivel de exportaciones para el año 2011. En cambio, se pronostica que la mayor parte de la ampliación del comercio dependerá del aumento de las entregas de Argentina y Nueva Zelanda. También se prevé un aumento de las ventas de Bielorrusia, proveedor principal de la Federación de Rusia. Para el caso de las exportaciones mundiales de leche desnatada en polvo la Unión Europea, Nueva Zelanda, y los Estados Unidos son los tres proveedores principales del mercado (Cuadro 2). La demanda de importaciones sigue siendo firme en China, Indonesia, Malasia, México y Filipinas, juntos representan el 50 % del comercio mundial (FAO, 2012).



11.3. La producción nacional de leche

En 10 años la producción de leche de vaca en México creció alrededor de 1,401 millones de litros, pasando de 9,311 millones de litros en el año 2000 a 10,712 millones de litros para el año 2010 (Figura 2). Durante el año 2009 la producción fue de 10,592 millones de litros, la mayor parte de esa producción la aportaron 13 estados, mostrando superioridad Jalisco, el mayor productor de leche en México (CANILEC, 2012; SIAP-SAGARPA, 2012).



Fuente: (CANILEC, 2012)

* Avances enero 2012

Figura 2. Estadísticas de la producción de leche de vaca en México, período 2000-2012 (millones de litros)

De la producción nacional total de leche de vaca en el año 2009, Jalisco produjo 1,919,567 miles de litros, con un coeficiente de agostadero de 8.50 hectáreas/unidad animal/año, Coahuila 1,282,880 miles de litros, con un coeficiente de agostadero de 26.02 hectáreas/unidad animal/año, Durango 959,681 miles de litros, con un coeficiente de agostadero de 15.70 hectáreas/unidad animal/año y Chihuahua 919,772 miles de litros, con un coeficiente de agostadero de 20.07 hectáreas/unidad animal/año; el resto de la producción para ese año se cubrió

por los estados de Guanajuato, Veracruz, Estado de México, Hidalgo, Aguascalientes, Puebla, Chiapas, Michoacán y Querétaro (CNOG, 2009).

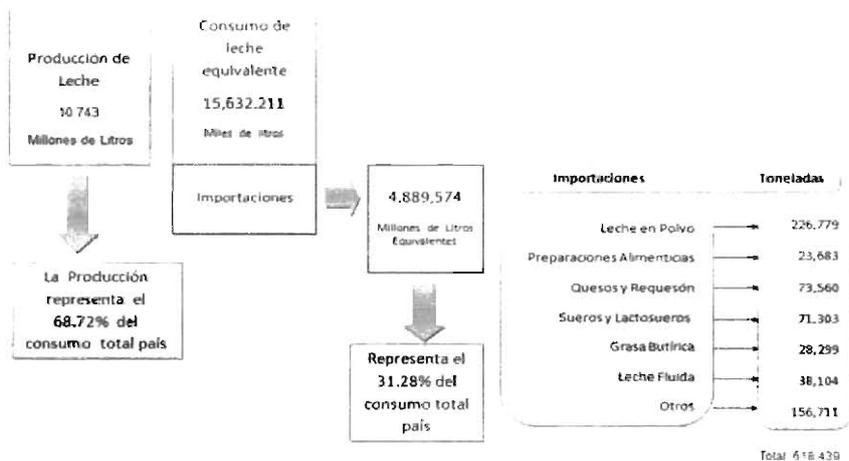
En Jalisco, Coahuila, Durango y Chihuahua, dadas sus condiciones climáticas, prevalecen los sistemas productivos intensivos o especializados, con rendimientos promedio de 5000 litros anuales con 15 a 17 litros por cabeza al día, y un periodo de lactancia que fluctúa entre 210 y 305 días al año. Al respecto, destaca por su importancia en la oferta nacional la región de la Comarca Lagunera, Delicias en el estado de Chihuahua y Tijuana en Baja California, cuencas lecheras con una elevada tecnificación (CNOG, 2009; CANILEC, 2012).

En Guanajuato, Estado de México, Hidalgo, Aguascalientes, Puebla, Michoacán y Querétaro con coeficientes de agostadero de 10.20, 9.33, 6.41, 11.56, 7.82, 7.00 y 13.49 hectáreas/unidad animal/año respectivamente, prevalecen los sistemas productivos semi intensivos o semi especializados, con rendimientos promedio de 2,500 litros anuales con 8 a 10 litros por cabeza al día, y con un periodo de lactancia que fluctúa entre 210 y 305 días al año. En cuanto a Veracruz y Chiapas con coeficientes de agostadero de 1.81, 1.80 hectáreas/unidad animal/año respectivamente, predomina la ganadería de doble propósito con rendimientos promedio de 750 litros anuales con 4 a 5 litros por cabeza al día (CNOG, 2009; CANILEC, 2012).

Los 10, 592,306 miles de litros de leche de vaca producidos en el año 2009, representaron un valor comercial de cerca de 50,004.285 millones de pesos, con un hato de aproximadamente 7 millones de cabezas de las cuales 2.2 millones son ganado lechero especializado, fundamentalmente de la raza Holstein, que se encuentra principalmente en los sistemas de producción de leche intensivos o especializados, donde contribuye con poco más de la mitad de la producción del país. El resto de los animales, se encuentra en sistemas de producción semi intensivo y en los denominados de doble propósito (dedicados a la producción de leche y animales para el abasto de carne) predominantemente en climas tropicales y subtropicales (CNOG, 2009; FAO-GIEWS, 2010).



Durante el año 2011 la producción nacional fue de 10,743 millones de litros (Figura 2; Figura 3) sin embargo, esta cantidad tan sólo cubrió el 68.72 % del consumo nacional, siendo insuficiente para satisfacer la demanda total de la población; por lo que fue necesario importar 618,439 toneladas de materias primas y productos terminados (CANILEC, 2012; SIAP-SAGARPA, 2012).



Fuente: Modificado a partir de (CANILEC, 2012)

Figura 3. Producción, importación y consumo de leche, año 2011

Cuadro 3. Origen de las importaciones mexicanas de leche y productos lácteos, año 2011

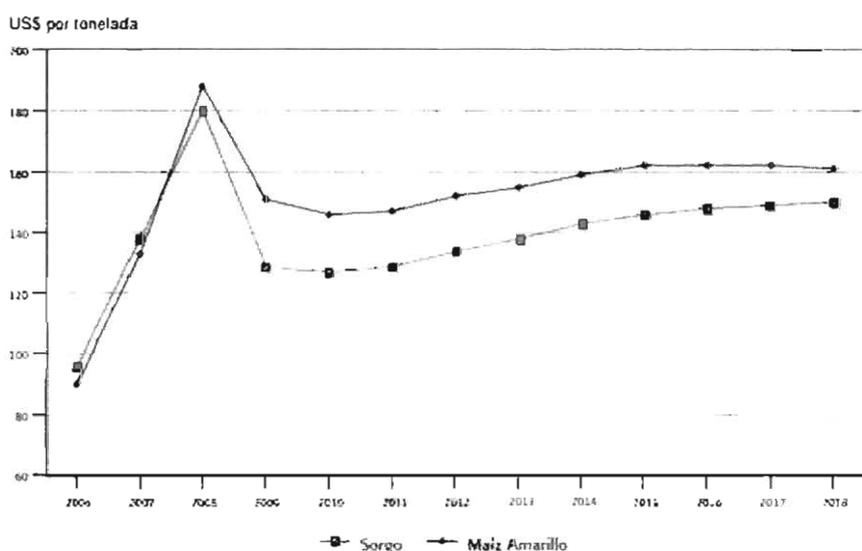
País	Toneladas (t)	Porcentaje (%)
Estados Unidos	431,331	69.75
Nueva Zelanda	74,542	12.05
Chile	20,494	3.31
Uruguay	18,376	2.97
Irlanda	15,247	2.47
Argentina	11,824	1.91
Holanda	9,102	1.47
Alemania	7,698	1.24
Singapur	5,068	0.82
Francia	4,022	0.65
Otros	20,735	3.36
Total	618,439	100

Fuente: (CANILEC, 2012)

De las 618,439 toneladas de materias primas y productos terminados importados el 36.67 % corresponde a leche en polvo, 3.83 % a preparaciones alimenticias, 11.89 % quesos y requesón, 11.53 % a sueros y lactosueros, 4.58 % a grasa butírica y sólo el 6.16 % a leche fluida (Figura 3) (CANILEC, 2012; SIAP-SAGARPA, 2012).

II. 4. Desafíos para el desarrollo competitivo del sector lechero mexicano

A diferencia del maíz blanco, los precios del maíz amarillo tienen una correlación mayor a los precios internacionales debido a que el mercado nacional de este cereal secundario es deficitario. En este contexto, el precio promedio del maíz amarillo en México ha enfrentado presiones al alza respondiendo a comportamientos inflacionarios en los mercados internacionales. El precio de este cereal en el año 2008 se ubicó alrededor de los US\$ 188 por tonelada (Figura 4) como consecuencia de la política energética de Estados Unidos, para después cotizarse en los años 2010 y 2011 en US\$ 146 y 147 por tonelada respectivamente, pronosticando un precio internacional para el año 2018 de US\$ 161 por tonelada (SAGARPA-SFA, 2012).



Fuente: (SAGARPA-SFA, 2012)

Figura 4. Comportamiento y pronóstico del precio (sorgo y maíz amarillo), período 2006-2018 (US\$ por tonelada)

El sorgo tiene un menor valor nutricional que el maíz amarillo; sin embargo, su menor precio en el mercado nacional y las importaciones de sorgo de alta calidad lo han convertido en un sustituto atractivo del maíz amarillo. Adicionalmente, este cereal secundario tiene una mayor tolerancia a las sequías que el maíz, por lo que presenta una ventaja comparativa natural en la producción. En Estados Unidos el precio de este cereal en el año 2008 se ubicó alrededor de los US\$ 180 (Figura 4) por tonelada, para después cotizarse en los años 2010 y 2011 en US\$ 127 y 129 por tonelada respectivamente. Esta tendencia ubicó al precio del sorgo en México en \$ 1,991 y \$ 1,850 por tonelada durante los años 2010 y 2011 respectivamente pronosticando un precio internacional para el año 2018 de US\$ 150 por tonelada (SAGARPA-SFA, 2012).

Por otra parte, el Tratado de Libre Comercio de América del Norte (TLCAN) que tuvo en el año 2008 la apertura total de maíz y frijol, en el año 2010 tuvo otra apertura mediante un acuerdo bilateral por el que se da a conocer el contingente arancelario para importar exenta de arancel, leche en polvo entre México y Estados Unidos. Como consecuencia, al quedar libre la importación de cualquier medida de protección como aranceles o cupos, las importaciones de leche desnatada y entera en polvo originarias de Estados Unidos se incrementaron (Cuadro 4).

Cuadro 4. Importaciones de leche en polvo provenientes de Estados Unidos, período 2010-2011 (toneladas)

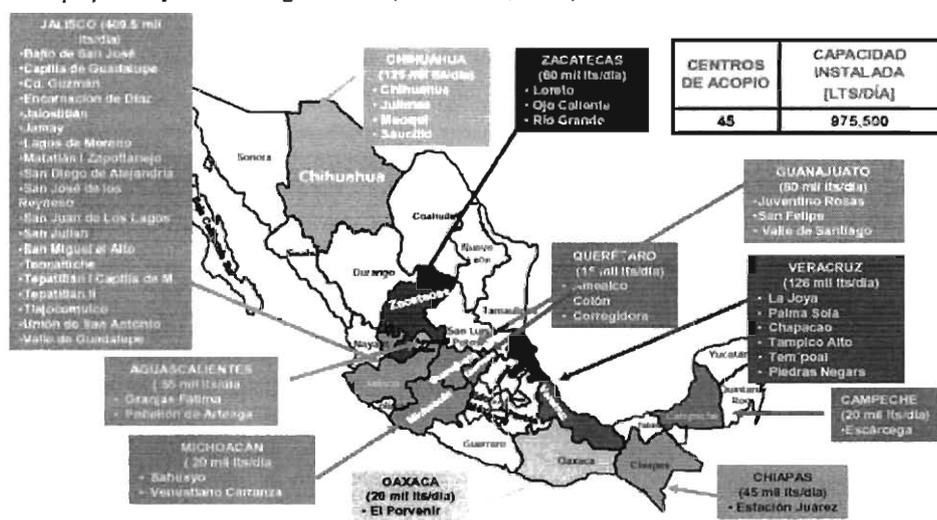
	2010	2011	Variación %
Leche fluida	42,148	38,104	-9.60 ^(a)
Leche desnatada en polvo	158,066	196,250	24.16
Leche entera en polvo	14,851	30,529	105.57
Preparaciones alimenticias	16,482	23,683	43.69
Sueros y lactosueros	75,216	71,303	-5.20 ^(a)
Quesos y requesón	81,362	73,560	-9.59 ^(a)
Leche evaporada	6,455	10,961	69.81
Leche condensada	14,725	15,260	3.63
Sub Total	409,306	459,649	12.30
Otras importaciones	156,604	158,789	1.40
Total	565,910	618,439	9.28

^(a) el signo negativo en el porcentaje de variación indica que disminuyeron las importaciones

Fuente: (CANILEC, 2012).

En el año 2011 las importaciones alcanzaron las 196,250 toneladas de leche desnatada en polvo, equivalente a una variación de 24.16 % con respecto al año 2010 (Cuadro 4) y de 30,529 toneladas de leche entera en polvo para el año 2011, equivalente a una variación de 105.57 % con respecto al año 2010 (CANILEC, 2012).

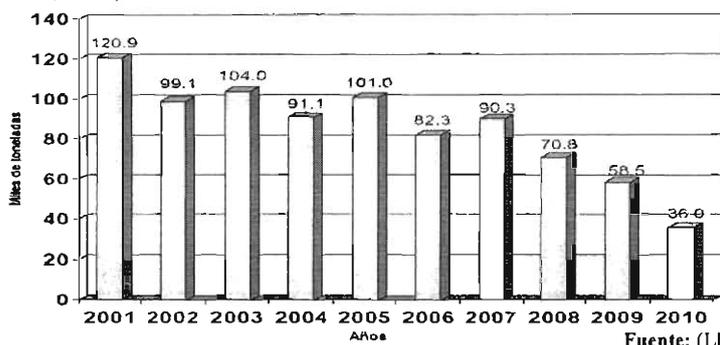
Debido al encarecimiento de los insumos, las fuertes importaciones de leche en polvo y la falta de una legislación que especifique al consumidor qué tipo de producto está comprando, se ocasionó la quiebra de cerca de 30 mil ganaderos durante el año 2009; los principales estados donde se ha registrado el mayor número de quiebras fueron Jalisco, Zacatecas, Aguascalientes, Hidalgo, Chihuahua, Michoacán, Querétaro y Guanajuato. Cerca del 40 % de las vacas de ganado lechero pertenecientes a los productores desaparecidos se dirigieron a los rastros con un precio de 8 mil pesos por cabeza, a pesar de que tenían buena productividad, según los reportes del Frente Nacional de Productores y Consumidores de Leche (MILENIO, 2010). Al respecto en el año 2010 LICONSA reportó que construyó y/o rehabilitó 45 centros de acopio y enfriamiento de leche fresca, con capacidad para manejar 975,500 litros de leche diarios (Figura 5). Los centros de acopio se localizaron en once entidades federativas atendiendo a las demandas de poco más de 10 mil pequeños y medianos ganaderos (LICONSA, 2010).



Fuente: (LICONSA, 2010).

Figura 5. Ubicación de los centros de acopio y enfriamiento de leche fresca de LICONSA año 2010

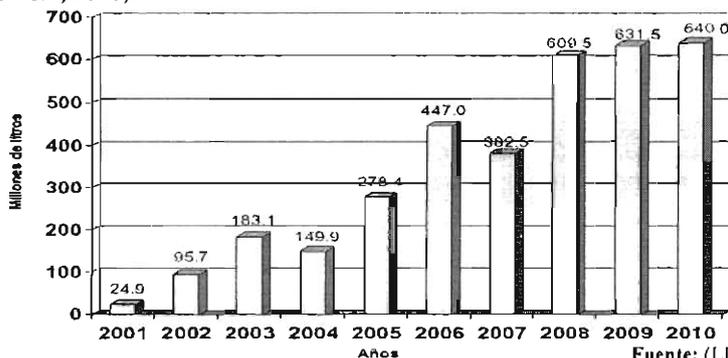
Hasta el inicio de la presente década prácticamente toda la leche que la empresa utilizaba como materia prima provenía de la importación. En el año 2001 LICONSA adquiría 120.9 miles de toneladas de leche en polvo (Figura 6) para descender hasta 36.0 miles de toneladas en el año 2010 (LICONSA, 2010).



Fuente: (LICONSA, 2010)

Figura 6. Evolución de la compra en el mercado internacional de LICONSA, período 2001-2010 (miles de toneladas)

Para el año 2002 se inició un programa de adquisición de leche producida en el país y en ese año LICONSA adquirió 95.7 millones de litros de leche nacional, en el año 2008 compró 609.5 millones de litros de leche nacional y para el año 2010 adquirió 640.0 millones de litros de leche producida en el país (Figura 7), asimismo durante el año 2010 compró 36.0 miles de toneladas de leche en polvo importada, que equivalen al 29.7 % de la leche adquirida en el año 2001 (LICONSA, 2010).

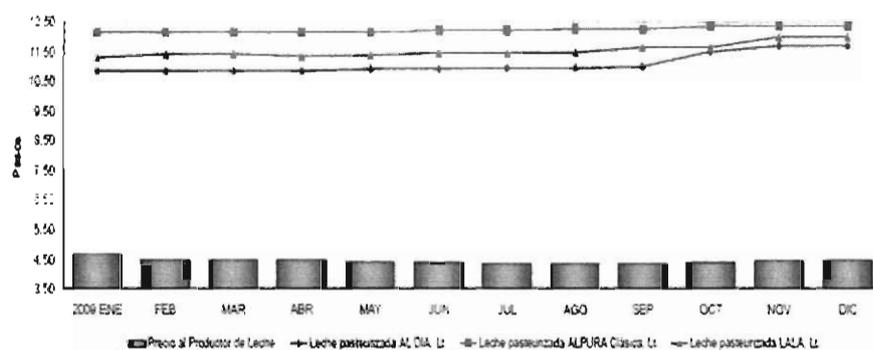


Fuente: (LICONSA, 2010)

Figura 7. Evolución de la compra en el mercado nacional de LICONSA, período 2001-2010 (millones de litros)

La leche en polvo que se importó en el año 2001 (120.9 miles de toneladas) significó el 97.3 % del total de lácteo que LICONSA distribuyó a sus 3 millones de familias beneficiadas, en tanto que para la leche en polvo que se importó en el año 2009 (58.5 miles de toneladas), esta proporción se redujo drásticamente al significar tan sólo el 33 % del total de lácteo que LICONSA distribuyó a sus ahora 6 millones 68 mil beneficiados (principalmente niños de hasta 12 años) a través de su programa de abasto social a un precio de 4 pesos el litro (LICONSA, 2010).

Sin embargo, la situación del sector nacional lechero se sigue agravando aún más, por la preferencia de los industriales hacia la leche en polvo que viene subsidiada de Estados Unidos debido a que les cuesta alrededor de 3 pesos por kilogramo y por la leche fresca nacional pagan entre 4.20 y 4.50 pesos por litro; no obstante, que ellos como industriales vendan la leche al consumidor de entre 10.50 y 12.50 pesos (Figura 8) (CNOG, 2009; FIRA, 2011).



Fuente: (CNOG, 2009)

Figura 8. Comparativo de precios promedio al consumidor y al productor de leche fluida, período 2009

Como respuesta a estos acontecimientos durante el año 2010 se dio a conocer una disposición de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) que exige a los importadores de leche fluida a partir del primero de octubre del año 2010, una certificación firmada por un médico veterinario autorizado; por lo tanto, este alimento tiene que esperar en la frontera 6 días para ser introducido a México debido a que la documentación que se requiere se tramita en Austin, Texas, poniendo en jaque a los

introdutores, ya que el producto caduca a los 15 días y solamente se tendrán 9 para comercializarse y consumirse (SAGARPA-SFA. 2012).

Debido a que la producción nacional es insuficiente para satisfacer la demanda total de la población, México requiere desarrollar empresas lácteas con elevados niveles productivos; sin embargo, cuanto más alto sea el potencial productivo del hato, mayor será el riesgo de provocar trastornos metabólicos en las vacas (Ospina *et al.*, 2010b; a). Por lo que la creación de modelos de simplificación biológica que permitan monitorear la salud del hato es imprescindible (van Saun, 2006).

III. MARCO TEÓRICO

III. 1. La gluconeogénesis hepática

Los carbohidratos más abundantes en las raciones para rumiantes son polisacáridos como celulosa, hemicelulosa, pectinas, fructanas y almidones. Con base en materia seca (MS), la celulosa puede alcanzar de 20 a 30 % de los carbohidratos, la hemicelulosa de 14 a 17 % y las pectinas hasta 10 %. Son pocos los productos vegetales que tienen cantidades considerables de disacáridos como la sacarosa (p. ej., la caña de azúcar) y menos aún los que contienen monosacáridos como la glucosa (Hristov *et al.*, 2005; Dann *et al.*, 2006; Gozho y Mutsvangwa, 2008; Duffield *et al.*, 2009).

De la glucosa que aporta la dieta, el 20 % se utiliza de manera directa y el 80 % es fermentada por bacterias ruminales y transformada en ácidos grasos volátiles de cadena carbonada corta (AGV): ácido acético (con dos carbonos), ácido propiónico (con 3 carbonos) y ácido butírico (con 4 carbonos). Estos ácidos son absorbidos a través de la pared ruminal por medio de difusión simple, mediante un intercambio con el bicarbonato sanguíneo; posteriormente son llevados en la sangre portal hasta el hígado, sin que haya entrada de dichos ácidos al sistema linfático. Sin embargo, en el hígado el ácido propiónico es el único que puede intervenir en la gluconeogénesis (Hristov *et al.*, 2005; González y Koenekamp, 2006; Walsh *et al.*, 2007; Gozho y Mutsvangwa, 2008; Duffield *et al.*, 2009).



El hígado es el órgano responsable de satisfacer las necesidades metabólicas de todos los tejidos corporales y responder ajustándose a cada una de ellas, por lo que reacciona produciendo una serie de adaptaciones, con la finalidad de abastecer la demanda de glucosa (Dann *et al.*, 2005; Goff, 2006; Krall, 2006; García y Montiel, 2011). Durante el período de transición (21 días previos y 21 días posteriores al parto), la capacidad del hígado para utilizar ácido propiónico en el proceso de gluconeogénesis, está reducida, a causa del balance energético negativo (BEN) en el que se encuentran las vacas y su consumo de energía neta de lactación (EN_L) corregida por grasa, por lo que este órgano utiliza vías alternas con sustratos gluconeogénicos endógenos, como lactato, lípidos y proteínas (Bauman *et al.*, 2006; Dann *et al.*, 2006; Correa y Carulla, 2009; Duffield *et al.*, 2009).

III. 1. 1. La desaminación oxidativa de aminoácidos

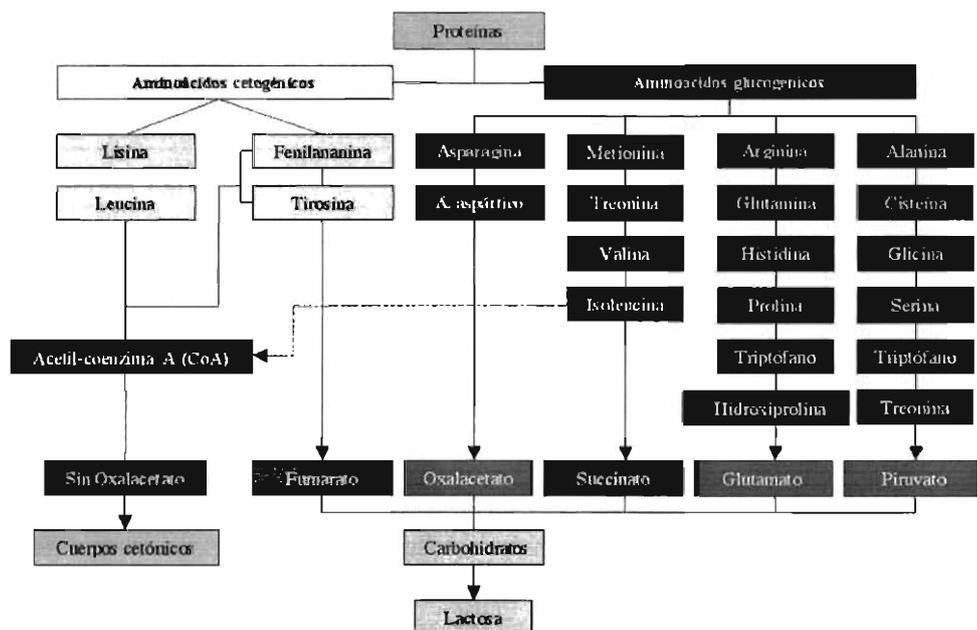
La máxima contribución en la gluconeogénesis ha sido estimada de 70 % para ácido propiónico, 10 % para aminoácidos, alrededor de 15 % para lactato y sólo 5 % para glicerol. La hidrólisis de la proteína requiere que los aminoácidos resultantes de la digestión proteica, sean desaminados o transaminados (eliminación o intercambio de grupos NH_2). Los aminoácidos que se transforman en carbohidratos se llaman glucogénicos (p. ej., alanina y glutamina que contribuyen entre el 40 y 60 % del potencial glucogénico) (Figura 9) (Hristov *et al.*, 2005; LeBlanc *et al.*, 2006; Walsh *et al.*, 2007; Gozho y Mutsvangwa, 2008; Duffield *et al.*, 2009).

Los aminoácidos hacen una contribución importante a la gluconeogénesis en rumiantes, excepto la lisina y la leucina, los cuales forman acetil-coenzima A (CoA) y son completamente cetogénicos (Hristov *et al.*, 2005; Bauman *et al.*, 2006; Dann *et al.*, 2006; Correa y Carulla, 2009; Duffield *et al.*, 2009).

Como resultado de la desaminación que se efectúa en las células hepáticas también se forma amoníaco (NH_3), por lo que este proceso contribuye a la formación de urea. El músculo esquelético es el principal abastecedor de aminoácidos para su desaminación oxidativa en la gluconeogénesis durante los primeros días del posparto temprano, y existen dos vías principales en el hígado de los mamíferos para destoxificar el amonio producto de dicha oxidación, la



ureagénesis y la síntesis de glutamina (Hristov *et al.*, 2005; González y Koenekamp, 2006; Walsh *et al.*, 2007; Gozho y Mutsvangwa, 2008; Duffield *et al.*, 2009).



Fuente: Elaboración propia a partir de (Hristov *et al.*, 2005; LeBlanc *et al.*, 2006; Walsh *et al.*, 2007; Gozho y Mutsvangwa, 2008; Duffield *et al.*, 2009)

Figura 9. Relación entre aminoácidos y carbohidratos

La concentración de amonio en el suero se mantiene entre los 30 y 80 μM en rumiantes. Cuando el amonio plasmático excede los 470 μM ocurre la toxicidad clínica aguda llamada hiperamonemia, también asociada a la falta de carbohidratos solubles en la dieta o con una alimentación elevada en nitrógeno no proteico (urea) o con un exceso de proteína degradable en rumen (Hristov *et al.*, 2005; LeBlanc *et al.*, 2006; Walsh *et al.*, 2007; Gozho y Mutsvangwa, 2008; Duffield *et al.*, 2009).

La acumulación de triacilglicérols (TAG) (Figura 10) en el citosol hepático de bovinos produce hígado graso: el contenido de estos triacilglicérols en el hepatocito comienza a aumentar entre los 21 a 25 días preparto de un 5 a 6 % del peso del hígado, normalizándose entre

los 40 a 45 días posparto. El pico máximo de infiltración hepática ocurre entre los 4 a 6 días preparto y se extiende hasta los 6 a 12 días posparto, con hasta un 25 % del peso del hígado, disminuyendo la capacidad de detoxificar amonio por urea. La inhibición de la síntesis de urea, produce una alcalosis en vacas preparto al bloquear la vía de remoción del bicarbonato y de reducción del pH sanguíneo, alcanzando inclusive una disminución en la movilización del calcio desde el hueso (Hristov *et al.*, 2005; González y Koenekamp, 2006; Walsh *et al.*, 2007; Correa y Carulla, 2009).

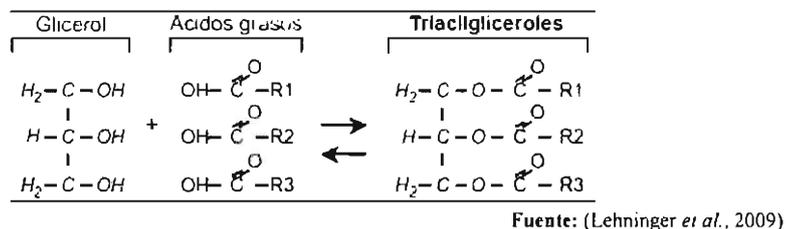


Figura 10. Triacilgliceroles: tres moléculas de ácidos grasos de igual o diferente tamaño de cadena, grado de saturación/insaturación e isomería, esterificados con una molécula de glicerol

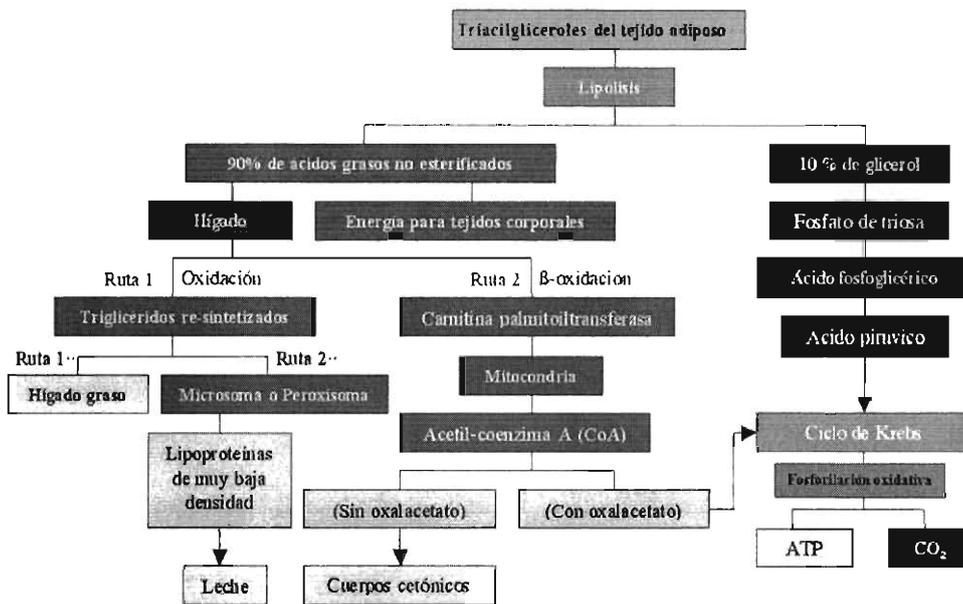
III. 1. 2. La oxidación y la β-oxidación de lípidos

El hígado además de ser el órgano encargado de responder a las necesidades metabólicas de todos los tejidos corporales, también requiere de oxidar fuentes primarias de carbono en términos de su propio aporte de energía como ácidos grasos no esterificados (AGNE) también llamados ácidos grasos libres (AGL), y metabolizar acetil-coenzima A producida por los ácidos acético y butírico, así como por la desaminación de aminoácidos cetogénicos (Bobe *et al.*, 2004; Sánchez, 2006; Walsh *et al.*, 2007; Correa y Carulla, 2009; Duffield *et al.*, 2009).

Los triacilgliceroles almacenados en el tejido adiposo durante la etapa de transición, experimentan una marcada lipólisis para compensar la elevada demanda energética, produciendo 10 % de glicerol y 90 % de ácidos grasos no esterificados, con su grupo carboxilo libre. Estos ácidos grasos pasan al torrente sanguíneo unidos de una forma no covalente a una proteína portadora, la albúmina sérica y sólo una pequeña porción está disponible como fuente de energía para los tejidos corporales (Bobe *et al.*, 2004; González y Koenekamp, 2006; Sánchez, 2006; Walsh *et al.*, 2007; Correa y Carulla, 2009; Martínez *et al.*, 2010).

La mayor cantidad de los ácidos grasos no esterificados llegan al hígado donde pueden seguir dos rutas metabólicas: 1) β -oxidación mitocondrial con la formación de acetil-coenzima A (Sánchez, 2006; Walsh *et al.*, 2007) y 2) síntesis *de novo* a triacilglicerol mediante el restablecimiento del enlace éster, facilitado por enzimas intrahepáticas como Fosfatidato fosfohidrolasa y Diacilglicerol aciltransferasa en el complejo triacilglicerol sintetasa ligado a una membrana del retículo endoplásmico hepático (Correa y Carulla, 2009).

A su vez los triacilglicerol sintetizados *de novo* pueden seguir dos rutas metabólicas nuevamente: 1) oxidación microsomal y participar en la formación de aminoácidos que sucesivamente se integran en lipoproteínas muy baja densidad. En este proceso no se forma ATP (adenosintrifosfato) si no que la energía se disipa como calor (Bobe *et al.*, 2004; Sánchez, 2006) y 2) almacenamiento en el citosol hepático, debido a que el hígado de los rumiantes presenta una baja capacidad para formar y exportar lipoproteínas de muy baja densidad ricas en triacilglicerol, formando hígado graso cuando este órgano presenta más del 20 % de su estructura como grasa (Walsh *et al.*, 2007; Correa y Carulla, 2009) (Figura 11).



Fuente: Elaboración propia a partir de (Bobe *et al.*, 2004, Dann y Drackley, 2005; González y Koenekamp, 2006, Walsh *et al.*, 2007, Correa y Carulla, 2009).

Figura 11. Metabolismo hepático de los lípidos

En rumiantes, cuando las reservas hepáticas de glucógeno disminuyen, la concentración de malonil-CoA decae y su efecto sobre la enzima carnitina palmitoiltransferasa desciende, induciendo un transporte de ácidos grasos no esterificados hacia el interior de la mitocondria hepática; una vez que los ácidos grasos se encuentra en la matriz mitocondrial, la carnitina palmitoiltransferasa se libera y ésta regresa al citoplasma (Bobe *et al.*, 2004; Dann y Drackley, 2005; Sánchez, 2006; Walsh *et al.*, 2007; Duffield *et al.*, 2009).

El segundo paso en el proceso de oxidación mitocondrial de los ácidos grasos no esterificados, consiste en una serie de sucesivas β -oxidaciones que conducen a la formación de acetil-coenzima A, la que requiere de combinarse con el oxalacetato para su ingreso al ciclo de Krebs donde los sucesivos metabolitos sufren oxidaciones con la formación de $\text{NADH} + \text{H}^+$. El transporte electrónico exergónico a través de los sistemas enzimáticos en la membrana interna mitocondrial, se acopla al proceso endergónico de la síntesis de ATP (Dann y Drackley, 2005; Dann *et al.*, 2005; González y Koenekamp, 2006; Martínez *et al.*, 2010).

Si esta oxidación es completa en el ciclo de Krebs, se liberara dióxido de carbono y pares de átomos de hidrogeno H^+ , que donarán sus electrones para efectuar una serie de reacciones de óxido reducción que culminan en la formación de agua y almacenamiento de la energía producida en forma de ATP (Figura 11) (Bobe *et al.*, 2004; Dann y Drackley, 2005; Dann *et al.*, 2005; González y Koenekamp, 2006; Walsh *et al.*, 2007; Correa y Carulla, 2009; Martínez *et al.*, 2010).

Sin embargo, si hay una producción insuficiente de oxalacetato disponible para combinarse con la acetil-coenzima A (CoA), ésta se acumula dentro de la mitocondria posteriormente dos moléculas de acetil-coenzima A se condensan vía enzimática para formar acetoacetil-CoA, a este proceso le sigue una segunda condensación vía enzimática para unir otro acetil-coenzima A y formar β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA. A partir de esta molécula se metaboliza acetoacetato (AcAc), cuerpo cetónico que sale de la mitocondria y entra en el citosol hepático donde puede reducirse en β -hidroxibutirato (β HBA) o descarboxilarse lenta y espontáneamente hasta acetona (Ac) (Figura 12; Figura 13), antes de abandonar el hígado y entrar a la circulación general (Bobe *et al.*, 2004; Dann *et al.*, 2005; Sánchez, 2006; Walsh *et al.*, 2007; Duffield *et al.*, 2009).



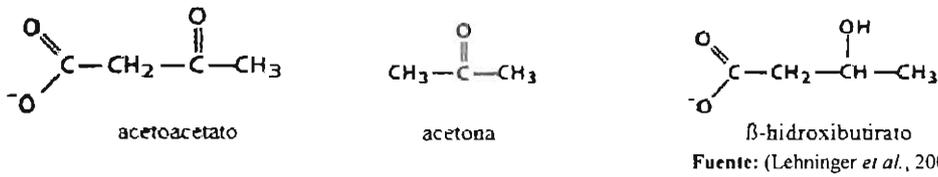
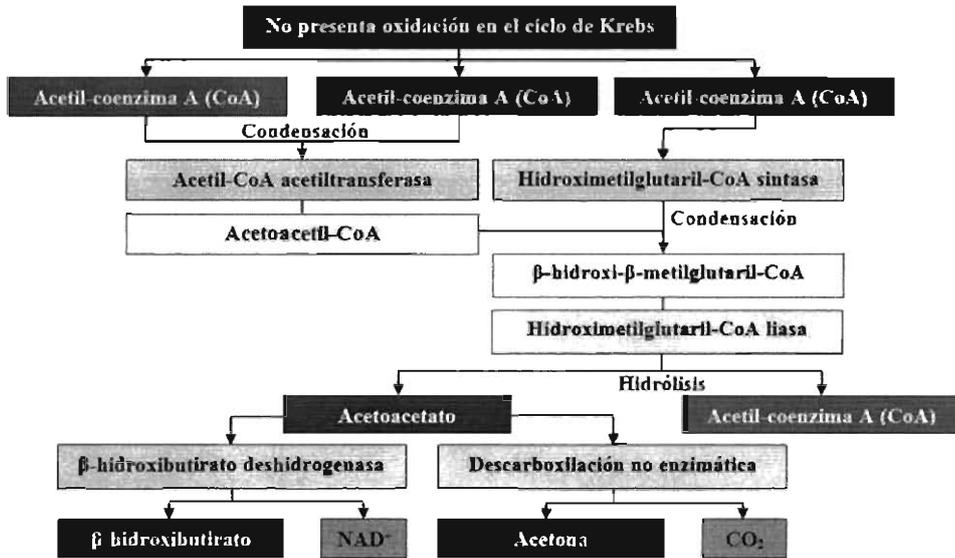


Figura 12. Cuerpos cetónicos: acetoacetato (AcAc), acetona (Ac) y β -hidroxibutirato (β HBA)



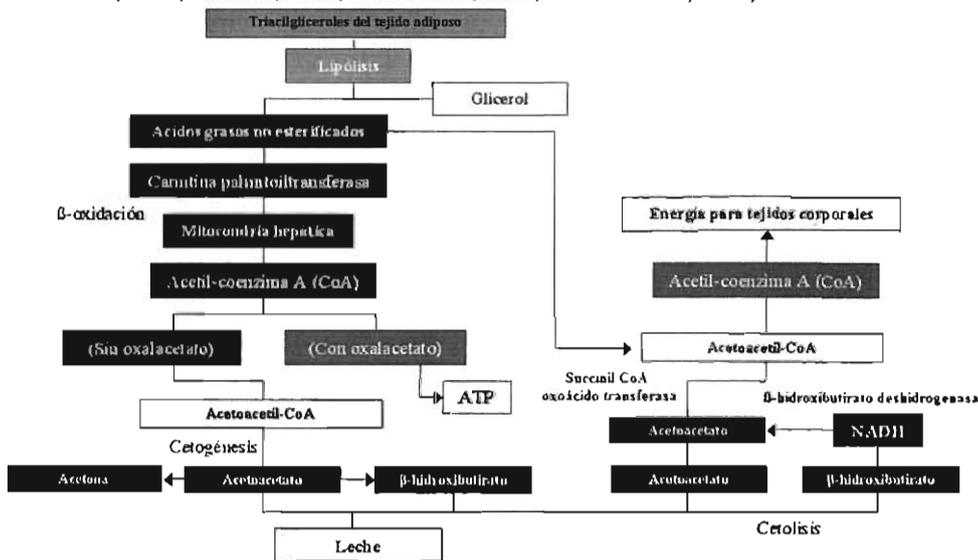
Fuente: Elaboración propia a partir de (Dann y Drackley, 2005; Dann *et al.*, 2005; Sánchez, 2006; Walsh *et al.*, 2007; Duffield *et al.*, 2009).

Figura 13. Cetogénesis

Aun cuando la demanda celular de energía es la determinante primaria para la oxidación de ácidos grasos no esterificados en la mitocondria, su transporte es sensible a la disponibilidad de carnitina palmitoiltransferasa; por lo que para evitar el exceso de ácidos grasos no esterificados y su re-síntesis en triacilgliceroles y almacenamiento en el citosol hepático, el hígado presenta una vía alterna de oxidación que no es regulada por esta enzima. Esta oxidación se realiza dentro de los microsomas llamados también peroxisomas y presenta un 12 % de aumento al día 1 posparto en relación al día 21 preparto (Dann y Drackley, 2005; González y Koenekamp, 2006; Sánchez, 2006; Walsh *et al.*, 2007; Duffield *et al.*, 2009).



La mayor parte de la degradación de las grasas ocurre en las células hepáticas, a partir de las cuales los cuerpos cetónicos y el glicerol salen y entran a la circulación. El glicerol a través de la circulación sistémica, puede entrar en el proceso de glucólisis para formar piruvato que será oxidado en el ciclo Krebs, produciendo dióxido de carbono y energía en forma de ATP, susceptible de utilizarse en cualquier actividad celular como transporte, biosíntesis y movimiento (Dann y Drackley, 2005; Dann *et al.*, 2005; Walsh *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2010). En cuanto a los cuerpos cetónicos, éstos son metabolitos oxidables normales cuando están presentes en niveles relativamente bajos dentro de la circulación sistémica, y pueden ser usados como una fuente adicional de energía por tejidos corporales solventando la escasez de glucosa (Figura 14). Sin embargo, cuando existen elevadas concentraciones de cuerpos cetónicos, el estado metabólico se encuentra comprometido, se disminuye la movilización de los ácidos grasos no esterificados, debido a que los cuerpos cetónicos sirven como reguladores de su liberación, a través de la reducción de la lipólisis elevando las concentración de malonil-CoA en el citosol, ocasionando la supresión de la actividad de la carnitina palmitoiltransferasa I y II y como consecuencia el balance energético negativo se perpetúa peligrosamente (Dann y Drackley, 2005; Dann *et al.*, 2005; Sánchez, 2006; Walsh *et al.*, 2007; Duffield *et al.*, 2009).



Fuente: Elaboración propia a partir de (Dann y Drackley, 2005; Dann *et al.*, 2005; Sánchez, 2006; Walsh *et al.*, 2007; Duffield *et al.*, 2009).

Figura 14. Metabolismo de los cuerpos cetónicos

Una vez estabilizada la glucemia, la movilización de ácidos grasos no esterificados se vuelve a moderar y se establece un nuevo estado, con la tasa de movilización de ácidos grasos no esterificados ajustada a los valores adecuados para mantener la concentración de glucosa en sangre (González y Koenekamp, 2006; Walsh *et al.*, 2007; Duffield *et al.*, 2009).

Tanto el acetoacetato como el β -hidroxibutirato son ácidos relativamente fuertes, por lo que durante la cetosis producen una acidosis sistémica que se manifiesta con el descenso del pH sanguíneo y son excretados en la orina (cetonuria) o en la leche (cetolactia). Por su parte la acetona al ser volátil, puede ser detectada por su olor en el aire expirado (Dann y Drackley, 2005; Dann *et al.*, 2005; Huzzey *et al.*, 2005; Goff, 2006; Krall, 2006).

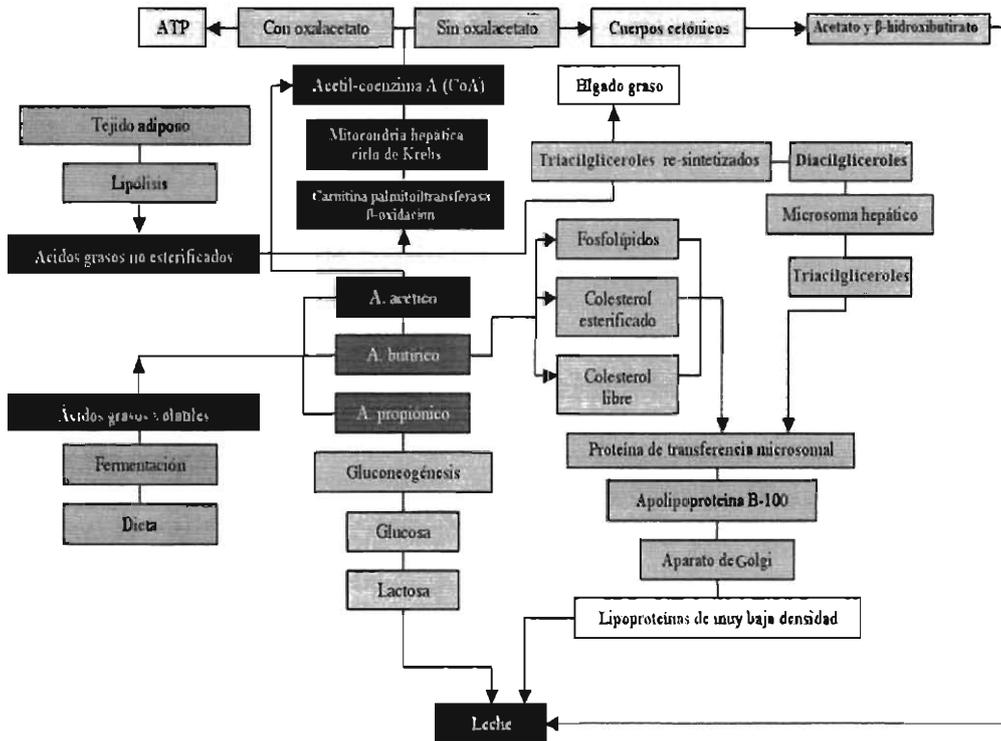
La cetosis subclínica es una de las principales patologías en los hatos lecheros de alta producción, está íntimamente ligada a otras patologías, y es de las que más pérdidas económicas provoca, alcanzando los US\$ 145 incluyendo tratamiento, disminución en la producción láctea por 1.4, 1.8, 3.2 y 4.2 kg de leche, al alcanzar una concentración en suero de 1400, 1600, 1800 y 2000 μM de β -hidroxibutirato respectivamente, aumento en los días abiertos al retrasar la concepción en dos semanas, por alteración del ciclo ovárico de los animales, asimismo incrementa tres veces la posibilidad de desarrollar cetosis clínica y desplazamiento de abomaso, y aumenta la posibilidad de desarrollar mastitis clínica (Dann y Drackley, 2005; Dann *et al.*, 2005; González y Koenekamp, 2006; Walsh *et al.*, 2007; Duffield *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2010).

III. 1. 3. Lipoproteínas de muy baja densidad

La gran cantidad de ácidos grasos no esterificados que llegan al hígado provoca una infiltración de grasa y la re-síntesis de triacilgliceroles que se almacenan en el citosol. Sin embargo, debido a que el hígado de los rumiantes en comparación con los no rumiantes es deficitario en las enzimas lipoproteína lipasa y lipasa hepática, los triacilgliceroles re-sintetizados almacenados en el citosol deben ser hidrolizados a nivel de diacilgliceroles, y transferidos hacia un pequeño banco de reservas secretorio dentro de los microsomas o peroxisomas. Donde son nuevamente re-sintetizados a triacilgliceroles para ser unidos a lipoproteínas de muy baja densidad (LMBD; densidad = 0.95 a 1.006 g/mL) (Figura 15). Por consecuencia se obtiene un nivel bajo en la

exportación de triacilgliceroles incorporados a estas lipoproteínas en comparación con los no rumiantes (González y Koenekamp, 2006; Walsh *et al.*, 2007; Duffield *et al.*, 2009; Navarro *et al.*, 2009).

La síntesis y secreción de lipoproteínas de muy baja densidad, requiere de 50 a 55 % triacilgliceroles, 18 a 20 % fosfolípidos, 12 a 15 % colesterol esterificado con un ácido graso y 8 a 10 % colesterol libre (Figura 16). Estos lípidos deben ser agregados para su enlace a la apolipoproteína B-100, lo que ocurre gracias a la presencia de una proteína de transferencia microsomal de triacilgliceroles (MTP) (Dann y Drackley, 2005; Dann *et al.*, 2005; González y Koenekamp, 2006; Walsh *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2009).

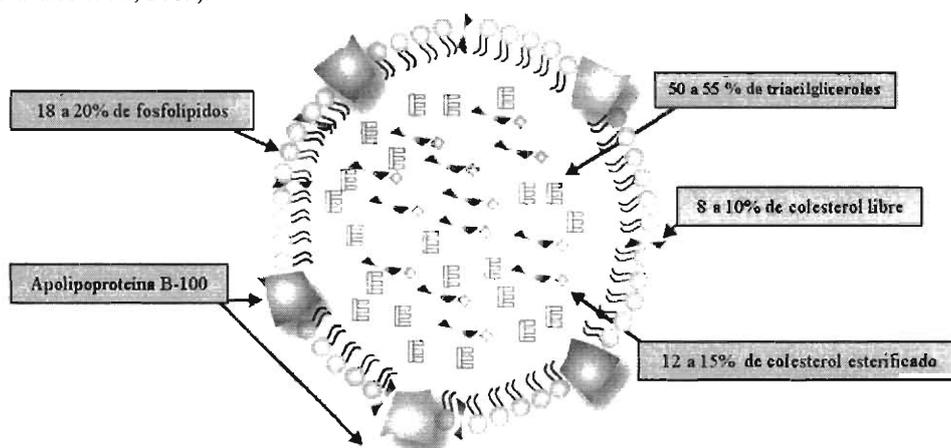


Fuente: Elaboración propia a partir de (González y Koenekamp, 2006; Walsh *et al.*, 2007; Duffield *et al.*, 2009; Navarro *et al.*, 2009)

Figura 15. Metabolismo hepático de los ácidos grasos

Los triacilgliceroles y el colesterol esterificado a un ácido graso son insolubles en el medio acuoso por lo que para poder ser transportados en la sangre deben estar cubiertos por moléculas anfipáticas, formando lipoproteínas de muy baja densidad (Duffield *et al.*, 2009; Navarro *et al.*, 2009).

El colesterol libre y los fosfolípidos se localizan en exterior hidrofílico; por lo tanto interactúan con el entorno acuoso (Figura 16), en el interior se alojan las sustancias hidrofóbicas como el colesterol esterificado a un ácido graso y los triacilgliceroles. La apolipoproteína B-100 es necesaria para la estabilización de la molécula en forma de agregado esférico, de manera que cualquier interferencia en su elaboración tiene un efecto depresor sobre la formación de estas lipoproteínas y la consecuente reducción en la exportación de triacilgliceroles desde el hígado (Dann y Drackley, 2005; Dann *et al.*, 2005; González y Koenekamp, 2006; Walsh *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2009).



Fuente: Modificado a partir de (Navarro *et al.*, 2009).

Figura 16. Estructura de lipoproteínas de muy baja densidad

Las vacas lecheras disminuyen fuertemente el consumo en los últimos 21 días antes del parto, lo que condiciona el estrés del parto no solamente a la resultante de la liberación de ácidos grasos no esterificados desde el tejido adiposo, sino también a la declinación de los niveles séricos de la S-adenosilmetionina y de la colina, precursores de la síntesis de fosfatidilcolina, que juega un rol importantísimo para la secreción de apolipoproteína B-100 en la célula hepática

(Dann y Drackley, 2005; Dann *et al.*, 2005; González y Koenekamp, 2006; Walsh *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2009).

III. 2. El período de transición del ganado lechero

III. 2. 1. Adaptaciones metabólicas

Las vacas lecheras durante el periodo de transición que abarca de 21 días previos a 21 días posteriores al parto realizan ajustes metabólicos y una adaptación de su sistema digestivo, con cambios cuantitativa y cualitativamente importantes (Bauman *et al.*, 2006; Correa y Carulla, 2009; Duffield *et al.*, 2009).

El período seco se divide en dos sub-periodos, el período seco fresco y período seco preparto. El período seco fresco abarca las primeras tres semanas desde el momento en que la vaca es secada. Durante este período con la finalidad de recuperar el tejido de la glándula mamaria reduciendo la producción láctea, se deja de aportar concentrados en el alimento y paralelamente se traslada las vacas a potreros de baja calidad nutricional, con lo que el perfil y cantidad de nutrientes absorbidos por el animal cambian drásticamente, lo que implica, reajustes en el metabolismo de los animales y en su microflora ruminal que pasa de ser Gram+ amilolítica, a Gram- celulolítica. Como consecuencia de lo anterior, las concentraciones de los productos finales de la fermentación ruminal se modifican lo mismo que el pH del rumen, factores determinantes en el crecimiento y desarrollo de las papilas ruminales, por lo que éstas pierden casi 2/3 de su longitud llegando a medir 0.5 cm al final del período seco fresco (Dann *et al.*, 2005; Goff, 2006; Krall, 2006; García y Montiel, 2011).

El período seco preparto es quizá el periodo más crítico y comprende las cuatro últimas semanas antes del parto. Los cambios en el consumo de materia seca así como en el estado hormonal y metabólico de los animales, se presentan de manera dramática en esta fase. Durante este período se incorpora a las raciones cantidades importantes de cereales (almidón con mayor densidad energética). Cuando esto sucede de forma violenta se desencadena un incremento en la flora bacteriana amilolítica (de 3 a 5 días) (p. ej., *Streptococcus bovis* y *Bacteroides amylophilus*) y se produce gran cantidad de ácido láctico, con un logaritmo negativo de la constante de



disociación (pKa) de 3.86 (Dann *et al.*, 2005; Krall, 2006; LeBlanc *et al.*, 2006; Mulligan *et al.*, 2006a; Goldhawk *et al.*, 2009).

En un rumen bien adaptado, las bacterias utilizadoras de ácido láctico (p. ej., *Megasphaera elsdenii* y *Selenomonas ruminantium*), lo metabolizan a otros compuestos menos ácidos como acético con un pKa de 4.76 y propiónico con un pKa de 4.87; sin embargo, el desarrollo de este tipo de bacterias es lento (de 3 a 4 semanas), por lo que se produce un retraso en el desarrollo de las papilas ruminales debido a que su crecimiento depende fundamentalmente de la presencia de ácido propiónico, producto de la fermentación de los almidones (Bauman *et al.*, 2006; LeBlanc *et al.*, 2006; Mulligan *et al.*, 2006a; Correa y Carulla, 2009; LeBlanc, 2010).

Los ácidos grasos volátiles que se absorben con relativa facilidad en el rumen, no pueden absorberse a la velocidad adecuada debido a la reducción del tamaño de las papilas ruminales, (0.5 cm de longitud durante el período seco fresco), ocasionado por el previo incremento de forrajes con mayor cantidad de fibra detergente neutra (FDN) en el alimento y el aumento en la flora bacteriana celulolítica. Para lograr recuperar el potencial de absorción del rumen es necesario lograr que el largo de las papilas aumente hasta 1-1.5 cm (Dann *et al.*, 2005; Krall, 2006; LeBlanc *et al.*, 2006; Mulligan *et al.*, 2006a; Goldhawk *et al.*, 2009).

Durante el posparto temprano el hecho de pasar de un estado de preñez y sin producir leche a estar vacía y produciendo grandes cantidades de leche, le exigen al animal una elevada capacidad de adaptación a las nuevas condiciones metabólicas y fisiológicas. Pero dicha capacidad de adaptación no basta, por lo que son necesarias prácticas de manejo adecuadas. De lo contrario, la combinación de la producción masiva de ácido láctico, la adaptación lenta de las poblaciones microbianas que utilizan dicho ácido, y la reducida capacidad de absorción de la pared ruminal, resultará en la posibilidad de aparición de patologías metabólicas (p. ej., cetosis e hígado graso), nutricionales (p. ej., hipocalcemia, acidosis ruminal y desplazamiento de abomaso), sanitarias (p. ej., mastitis y metritis), y productivas (p. ej., baja producción de leche y relación grasa: proteína desestabilizada) (Bauman *et al.*, 2006; Correa y Carulla, 2009; Duffield *et al.*, 2009).

III. 2. 2. Adaptaciones endocrinas durante el período de transición

Las hormonas que actúan aumentando la gluconeogénesis en el hígado de vacas lecheras en el parto incluyen a la insulina, glucagón, leptina, somatotropina, glucocorticoides como el cortisol, factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I), progesterona y estrógenos. Los animales en balance energético negativo se caracterizan por niveles sanguíneos elevados de somatotropina y ácidos grasos no esterificados, y niveles bajos del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I, insulina, y glucosa. En estas condiciones, los mecanismos de la regulación homeorrética establecen la prioridad de utilización de nutrientes hacia la producción de leche por encima de la función reproductiva; por lo tanto, es de esperar que las vacas de mayor producción tengan un menor porcentaje de energía disponible para funciones reproductivas en situaciones de balance energético negativo (Bauman *et al.*, 2006; Walsh *et al.*, 2007; Watters *et al.*, 2008).

Durante el primer tercio de la lactancia, la concentración de insulina cae, debido al balance energético negativo, baja disponibilidad de glucosa y de sus precursores el propionato, lactato y glicerol asociado a una disminución en la respuesta del páncreas a agentes insulínotropicos ocasionando un estado de hipoglucemia. La insulina estimula la formación de proteínas y promueve la lipogénesis en el tejido adiposo, provocando la formación de triacilglicérols a partir de los ácidos grasos no esterificados por lo que inhibe la lipólisis, por una marcada supresión de la movilización de dichos ácidos (Goff, 2006; LeBlanc *et al.*, 2006; Mulligan *et al.*, 2006a).

La insulina presenta una vida media en la circulación de 5 a 10 minutos y sus concentraciones sanguíneas son bajas durante el período de transición, por lo que las pocas reservas de glucosa se dirigen hacia la glándula mamaria como fuente de energía para la síntesis de lactosa (Bauman *et al.*, 2006; Walsh *et al.*, 2007; Watters *et al.*, 2008).

La baja cantidad de insulina hace que ésta pierda su bloqueo estimulador sobre el glucagón, por lo que éste favorece el aumento de la gluconeogénesis. Además, el glucagón promueve la lipólisis mediante la activación de la enzima carnitina palmitoiltransferasa, estimulando la entrada de ácidos grasos no esterificados al interior de la mitocondria, con la



síntesis de cuerpos cetónicos (Bauman *et al.*, 2006; Mulligan *et al.*, 2006a; Angulo *et al.*, 2009; LeBlanc, 2010).

La insulina aparte de mantener la glucemia, participa en la estimulación de la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH), la secreción pulsátil de la hormona luteinizante (LH) y la secreción de progesterona por parte del cuerpo lúteo; por lo tanto, niveles bajos de insulina en sangre pueden resultar en bajas concentraciones de progesterona que durante el principio de lactación, es una de las causas más comunes del fallo reproductivo en los bovinos lecheros. Además, la insulina parece ser la principal responsable de la disminución del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I, durante el posparto; el descenso de este factor de crecimiento o de sus receptores durante este período, resulta en graves consecuencias reproductivas que incluyen un desarrollo lento y anormal de los folículos, que nunca llegan a la ovulación (Bauman *et al.*, 2006; Walsh *et al.*, 2007; Watters *et al.*, 2008; LeBlanc, 2010).

Las concentraciones de somatotropina aumentan lentamente luego del parto. La somatotropina está involucrada en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa y actúa de manera similar al glucagón, con un efecto directo promoviendo la gluconeogénesis al aumentar la disponibilidad de glucosa y con un efecto indirecto a través del antagonismo que ejerce sobre la acción de la insulina (Bauman *et al.*, 2006; Walsh *et al.*, 2007; Watters *et al.*, 2008).

La relación somatotropina + glucagón / insulina en los niveles sanguíneos, genera un incremento importante en la liberación de ácidos grasos no esterificados del tejido adiposo, invirtiendo la relación lipogénesis / lipólisis. Esta relación es importante, debido a que cada hormona afecta a la lactancia de manera antagónica (LeBlanc *et al.*, 2006; Mulligan *et al.*, 2006a; Galvis *et al.*, 2007; LeBlanc, 2010).

Mientras que las vacas de alta producción presentan elevadas concentraciones de somatotropina con elevada capacidad para movilizar ácidos grasos no esterificados desde tejido adiposo y bajas concentraciones de glucosa e insulina, las vacas de menor producción presentan menores concentraciones de somatotropina por lo tanto su capacidad de movilizar ácidos grasos no esterificados desde tejido adiposo es baja y elevadas concentraciones de insulina por lo que

una mayor cantidad de glucosa es destinada a tejidos corporales. Estas características tienen como efecto una menor producción láctea (LeBlanc *et al.*, 2006; Mulligan *et al.*, 2006a; Galvis *et al.*, 2007; LeBlanc, 2010).

En rumiantes, la secreción de leptina está correlacionada con los niveles del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I. Al ser una hormona secretada por el tejido adiposo, la concentración de leptina en sangre es mayor cuanto mayor sea la proporción de grasa corporal. Por lo tanto, es muy importante que se apliquen programas nutricionales que aseguren que los niveles de grasa corporal durante el parto no sean elevados o deprimirán la ingestión, ni demasiado bajos o no se secretaría suficiente leptina para permitir una buena función reproductiva (LeBlanc *et al.*, 2006; Mulligan *et al.*, 2006a; Galvis *et al.*, 2007; LeBlanc, 2010).

El cortisol también estimula el proceso de gluconeogénesis, al inducir la movilización de proteínas de los tejidos que suplen aminoácidos para ser convertidos en hidratos de carbono para la producción de energía. En vacas lecheras la concentración de cortisol comienza a elevarse para incrementar dramáticamente la glucosa por lo menos 3 días antes del parto y alcanza un pico máximo al parto agotando las reservas hepáticas de glucógeno; luego, disminuye a su concentración preparto de 3 a 5 días de ocurrido éste (Bauman *et al.*, 2006; Walsh *et al.*, 2007; Watters *et al.*, 2008).

Los estrógenos y los glucocorticoides son agentes inmunosupresores que se elevan a medida que se acerca el parto, comprometiendo al sistema inmunológico durante el período de transición al deprimir la función de los neutrófilos y los linfocitos (Bauman *et al.*, 2006; Walsh *et al.*, 2007; Watters *et al.*, 2008; LeBlanc, 2010).

Las reservas hepáticas de glucógeno se recuperan y aumentan hacia la segunda semana posparto, a pesar de la demanda de glucosa para la síntesis de lactosa por la ubre después del parto, debido al incremento en la gluconeogénesis necesaria para la lactancia; a medida que la lactancia progresa y la producción de leche disminuye, los niveles séricos de insulina son recuperados (Bauman *et al.*, 2006; Walsh *et al.*, 2007; Watters *et al.*, 2008).



III. 2. 3. El balance energético negativo

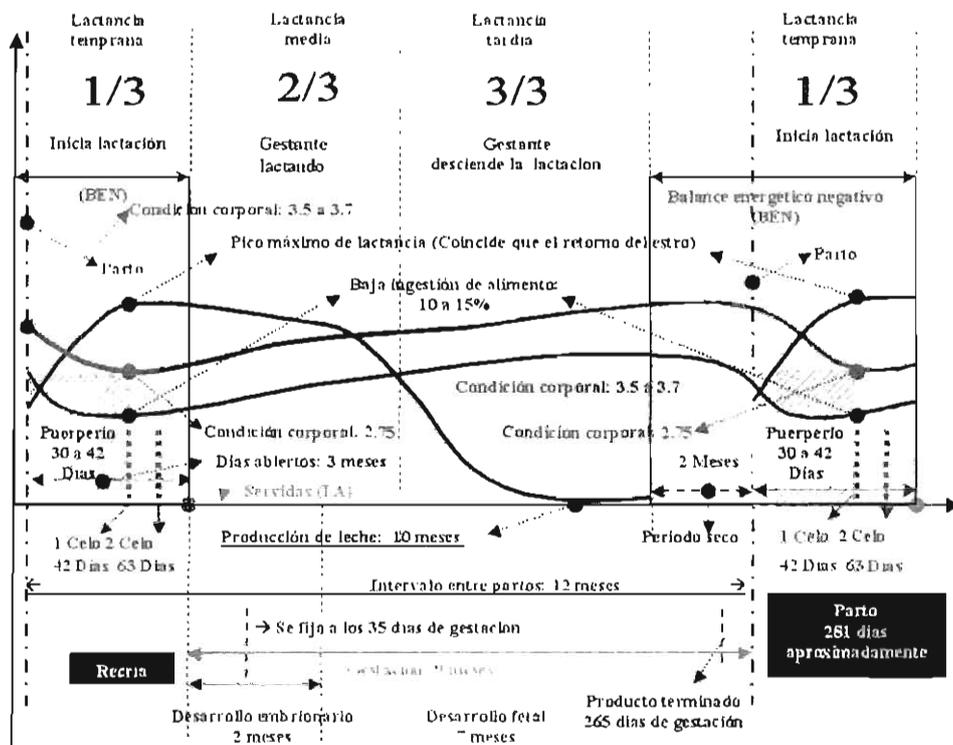
El balance energético negativo (BEN) es la consecuencia de las condiciones que caracterizan al período seco preparto y se entiende como el déficit energético entre el consumo de energía por parte del animal y la energía requerida para el mantenimiento y la preñez en la vaca gestante y el mantenimiento y la lactación en la vaca lactante (Bauman *et al.*, 2006; Goff, 2006; LeBlanc *et al.*, 2006; Correa y Carulla, 2009; LeBlanc, 2010).

Durante el período de transición que abarca de 21 días previos a 21 días posteriores al parto, se produce un aumento sustancial de las necesidades energéticas debido al desarrollo fetal y a las necesidades de síntesis de calostro. El consumo de materia seca desde los 60 hasta los 21 días previos al parto es de 12 a 13 kg (2 % del peso vivo), en la tercera semana previa al parto la capacidad de consumo comienza a disminuir llegando el día antes del parto de 7 a 9 kg (1.4 % del peso vivo), lo equivalente a un 30 a 35 % de disminución; posteriormente la capacidad de consumo comienza a incrementarse. A los 7 días de lactación el consumo de materia seca es de 14 a 15 kg (2.5 % peso vivo), a los 14 días de lactación es de 17 a 18 kg (2.9 % peso vivo) y a los 21 días de lactación es de 19 a 20 kg (3.4 % peso vivo) (Dann *et al.*, 2005; Dann *et al.*, 2006; Douglas *et al.*, 2006; Mulligan *et al.*, 2006a; Cuervo, 2009).

El balance energético negativo normalmente alcanza su pico máximo durante la primera a segunda semana del posparto. Los requerimientos de energía de la vaca se incrementan con el aumento de la producción y alcanzan el máximo aproximadamente seis semanas después del parto (Figura 17). Por otro lado, el consumo máximo de energía podría no alcanzarse hasta la semana dieciséis posparto, por consiguiente la vaca puede alcanzar un balance energético positivo alrededor de los cien días posparto (Huzzey *et al.*, 2005; Krall, 2006; LeBlanc *et al.*, 2006; Duffield *et al.*, 2009; LeBlanc, 2010).

El ganado bovino tiene la capacidad de compensar el déficit alimentario de energía a través de la movilización de grasa corporal. Sin embargo, un exceso de movilización de grasa conduce a problemas patológicos y reproductivos. El déficit energético, conduce a una disminución de los niveles de glucosa e insulina en sangre que estimula la movilización de grasa,

resultando en un aumento de los ácidos grasos no esterificados en sangre, duplicando su cantidad entre los diecisiete días preparto y los dos días posparto. Estos ácidos grasos se utilizan como fuente de energía por la β -oxidación, pero cuando la movilización de ellos es excesiva, se saturan las vías de metabolización y exportación de lípidos, y se generan vías hepáticas alternativas entre las que la formación y exportación de cuerpos cetónicos, y la formación y almacenamiento hepático de triacilgliceroles son las más frecuentes (Ríos *et al.*, 2006; Winkelman *et al.*, 2008; Duffield *et al.*, 2009).



Fuente: Elaboración propia a partir de (Huzzey *et al.*, 2005, Krall, 2006; LeBlanc *et al.*, 2006, Duffield *et al.*, 2009; LeBlanc, 2010)

Figura 17. Balance energético negativo, curva de lactancia, curva de ingestión y recría

La duración óptima del período seco para maximizar el rendimiento lechero es de 55 a 65 días. Períodos muy largos de más de 70 días y períodos muy cortos de menos de 40 días reducen el rendimiento de la siguiente lactación, expresado en baja calidad con menos sólidos totales y

baja cantidad de leche. El período seco no debe ser el momento de restaurar las reservas corporales, perdidas durante la lactancia anterior debido a dos razones fundamentales (Huzzey *et al.*, 2005; Cuervo, 2009; Goldhawk *et al.*, 2009):

1. La vaca es más eficiente desde el punto de vista metabólico, durante el final de la lactancia en comparación con el período seco; por lo que en términos de energía es más caro recuperar el estado de la vaca durante el período seco.
2. Los 60 días de período seco pueden ser insuficientes para restaurar las reservas corporales si la pérdida durante la lactancia ha sido excesiva.

III. 3. Recomendaciones para la etapa de transición

III. 3. 1 Evaluación del estado corporal

La escala más difundida para la evaluación del estado corporal de las vacas asigna puntajes que van del 1 al 5, donde el 1 representa a una vaca muy caquéctica y el 5 a una vaca obesa. Idealmente la vaca se debe secar y llegar al parto con un estado corporal entre 3.5 y 3.7 (Figura 17; Cuadro 5) (Bauman *et al.*, 2006; Goff, 2006; LeBlanc *et al.*, 2006; Galvis *et al.*, 2007; Correa y Carulla, 2009; LeBlanc, 2010). Las vacas que paren caquécticas tendrán menos reservas corporales para movilizar, por lo tanto tendrán picos de lactancia más bajos y demorarán más en presentar celos, alargándose el intervalo parto-concepción (Galvis *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2007; Goldhawk *et al.*, 2009).

Cuadro 5. Valores óptimos de condición corporal

Puntos de la etapa de lactación	Valor de condición corporal
Parto	3.5 a 3.7
Pico máximo de producción (42 días aprox.)	2.75
Lactancia media (2/3 de lactación)	3
Lactancia tardía (3/3 de lactación)	3.25
Período seco (2 meses)	3.5 a 3.7

Fuente: Elaboración propia a partir de (Bauman *et al.*, 2006, Goff, 2006, LeBlanc *et al.*, 2006, Galvis *et al.*, 2007; Correa y Carulla, 2009, LeBlanc, 2010).

Condición corporal grado 1:

Existe una profunda cavidad alrededor de la base de la cola. Los huesos de la cadera y las últimas costillas son prominentes y fácilmente palpables. En las áreas de la cadera y el lomo no se detecta presencia de tejido graso. Los huesos de la pelvis son agudos, con escaso tejido muscular. La piel de la zona es elástica y se separa sin dificultad con la punta de los dedos. El lomo presenta una profunda depresión (Duffield, 2004; Krall, 2006; Galvis *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2007).

Condición corporal grado 2:

La cavidad alrededor de la base de la cola aún persiste pero es menos profunda, con algo de tejido graso que puede palparse en la punta del espinazo, los huesos de la pelvis siguen siendo prominentes. Las últimas costillas aparecen algo redondeadas y se las puede palpar en su parte superior con una muy leve presión. En el lomo es todavía visible la depresión. Grado 2.5 (regular/flaca), es típico de vacas de elevado mérito genético durante la lactancia temprana, entre los primeros 30 a 35 días posparto. El descenso de la condición corporal desde el parto hasta el pico de lactancia, debe estar en alrededor de 0.5 y nunca mayor a 1 punto. Luego del pico de lactancia la condición corporal debe comenzar a mejorar un 0.5 hasta alcanzar el grado 3 durante el segundo tercio de la lactancia (Duffield, 2004; Galvis *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2007).

Condición corporal grado 3:

No existe cavidad alrededor de la base de la cola, el tejido graso si bien no es prominente se palpa con facilidad en toda el área. Las caderas pueden detectarse solamente ejerciendo una leve presión y son redondeadas al tacto. Una moderada capa de tejido graso cubre la parte superior de las últimas costillas y se necesita una presión más firme para palparlas. La depresión en el área del lomo no se ve con facilidad (Duffield, 2004; Krall, 2006; Galvis *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2007).

Condición corporal grado 4:

Se observan y palpan con facilidad las cubiertas de grasa alrededor de la cola y la punta del espinazo. Los huesos de las caderas se detectan con presión más firme y su aspecto es netamente redondeado. La piel es muy suave y es extremadamente difícil separarla con los dedos.



Una gruesa capa de tejido cubre la parte superior de las últimas costillas y se requiere mayor presión para palparlas. No existe depresión en el área del lomo (Duffield, 2004; Galvis *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2007).

Condición corporal grado 5:

La base de la cola se encuentra “sumergida” en una gruesa capa de grasa. Son muy difíciles de palpar los huesos de la zona, aún con una fuerte presión. Se observan a simple vista cúmulos de grasa localizados. Los huesos de la pelvis, tienen un aspecto totalmente redondeados. La piel esta tensa y es imposible separarla con los dedos. Los huesos del área del lomo están cubiertos por una densa capa de grasa, por lo que no se pueden palpar aún con fuertes presiones (Duffield, 2004; Krall, 2006; Galvis *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2007).

III. 3. 2. Relación forraje: concentrado de la ración pre y posparto

La reducción en el consumo de materia seca (MS) antes del parto, los cambios fisiológicos asociados a la gestación y al parto, adicionados a las necesidades de la glándula mamaria en la lactogénesis: 2 veces la demanda de aminoácidos, 5 veces la de ácidos grasos volátiles y 2.5 veces la de glucosa (aproximadamente 2500 g/día) como precursor de lactosa y para la síntesis de leche, han llevado a la necesidad de formular una ración especial para las vacas de preparto, capaz de reducir el riesgo de trastornos metabólicos en el período posparto y mejorar el rendimiento de la lactancia. El problema principal radica en que los requerimientos en consumo de materia seca y de nutrientes de la vaca en el período de preparto cambian con relativa rapidez (Galvis *et al.*, 2007; van Knegsel *et al.*, 2007a; Winkelman *et al.*, 2008; Correa y Carulla, 2009; Duffield *et al.*, 2009).

El final de la preñez requiere de grandes cantidades de recursos metabólicos, para el desarrollo de la unidad feto-placentaria que consume diariamente 0.82 Mcal de energía metabolizable (EM), 117 g de proteína, 10.3 g de calcio, 5.5 g de fósforo y 0.2 g de magnesio; por lo que en esta etapa fisiológica, la densidad energética de la dieta debe ser de 1.6 Mcal EM/kg de MS, la proteína del 14 al 17 %, (con 30 a 35 % de esa proteína en forma no degradable en el rumen), el aporte de hidratos de carbono no estructurales (HCNE) del 20 al 25 % de la MS y

el aporte de fibra neutro detergente (FDN) no superior al 0.86 % del peso vivo (PV) en vacas de primer parto y de 0.92 % en vacas adultas (Bauman *et al.*, 2006; Dann *et al.*, 2006; Correa y Carulla, 2009; Duffield *et al.*, 2009).

Cuando se produce el parto y comienza la producción de calostro, estos requerimientos se ven incrementados rápidamente. Así la producción de 10 litros de calostro por día requiere de 11 Mcal de EM, 140 g de proteína, 23 g de calcio, 9 g de fósforo y 1 g de magnesio; por lo que en esta etapa fisiológica, la densidad energética de la dieta debe ser de 2.4 a 2.8 Mcal EM/kg de MS, la proteína del 16 al 18 %, (con 38 a 42 % de esa proteína en forma no degradable en el rumen), el aporte de hidratos de carbono no estructurales del 35 al 41 % de la MS y el aporte de fibra neutro detergente no superior al 0.79 % del peso vivo en vacas de primer parto y del 0.87 % en vacas adultas (Bauman *et al.*, 2006; Dann *et al.*, 2006; Correa y Carulla, 2009; Duffield *et al.*, 2009).

Durante el periodo de transición, es importante balancear el nivel de concentrados y de fibra efectiva de los forrajes para reducir la selección, mantener o recuperar el tamiz fibroso para permitir que éste reduzca la tasa de pasaje de las partículas de granos de la ración, alentar el masticado del bolo alimenticio y el llenado y movimientos ruminales (al menos 10 % de la ración mixta total debe tener un tamaño de partícula mayor que 19 mm) (Dann *et al.*, 2005; Dann *et al.*, 2006; Douglas *et al.*, 2006; Mulligan *et al.*, 2006a; Mulligan *et al.*, 2006b; Mulligan y Doherty, 2008).

Se deben incorporar cereales secundarios con carbohidratos no fibrosos en las raciones de preparto, ya que se estimulará el desarrollo de las poblaciones de bacterias que utilizan el ácido láctico y así se permitirá que el ácido propiónico producido provoque el desarrollo de las papilas ruminales. En la actualidad se recomienda incrementar la concentración energética de la ración de 1.56 a 1.63 Mcal de EN_L/kg de materia seca con un 0.5 a 0.75 % del peso vivo del animal en forma de cereales (p. ej., de 3 a 4.5 kg de cereales en una vaca de 600 kg), y 1.6 kg de proteína/kg de materia seca (Duffield, 2004; Guo *et al.*, 2007; van Knegsel *et al.*, 2007a; van Knegsel *et al.*, 2007b).



Asimismo en las raciones de parto, se debe incluir una fuente de fibra para mantener la movilidad y salud del rumen (p. ej., gramíneas de buena calidad y en lo posible con un contenido bajo en calcio y potasio), de esta manera se busca mantener activa a la hormona paratiroidea (PTH), responsable de tres mecanismos de adaptación: reducción de la pérdida renal de calcio, movilización de calcio de los huesos y aumento en la síntesis de 1,25 (OH) 2-D3 colecalciferol. El silo de maíz es el forraje con más bajo nivel de potasio, por lo que es muy apropiado para las dietas de parto. Por el contrario, las leguminosas presentan niveles elevados de este mineral y de calcio, por lo que debe evitarse su uso en las semanas previas al parto (Bauman *et al.*, 2006; Dann *et al.*, 2006; Correa y Carulla, 2009; Duffield *et al.*, 2009).

En la mayoría de las dietas formuladas para vacas de alta producción basadas en maíz, el aporte de proteína bacteriana más el aporte de proteína dietaria que escapa a la fermentación ruminal, no cubren los requerimientos de los aminoácidos metionina y lisina que han sido relacionados como limitantes para la síntesis de proteína láctea, y para la síntesis de apolipoproteína B-100; por lo que el suministro de lisina, metionina o colina a vacas posparto aumentará la síntesis de fosfatidilcolina, la concentración hepática de apolipoproteína B-100 y la consecuente formación de lipoproteínas de muy baja densidad, disminuyendo el incremento de los triacilglicérols en el hígado, que durante el periodo de balance energético negativo es un depósito de grasa (Galvis *et al.*, 2007; van Knegsel *et al.*, 2007a; van Knegsel *et al.*, 2007b; Winkelman *et al.*, 2008; Correa y Carulla, 2009; Duffield *et al.*, 2009).

III. 4. El diagnóstico de la cetosis

El diagnóstico de la cetosis se basó por años en la determinación de los cuerpos cetónicos en muestras de orina o leche mediante el test Rothera, prueba que reacciona principalmente con acetona y acetoacetato y en menor grado a β -hidroxibutirato. Este método tiene un nivel de detección mayor de 10 mg/dL equivalentes a ± 1.7 mM. El test Rothera basa su principio en mezclar 74 % de carbonato de sodio, 25 % de sulfato de amonio y 1 % de nitroprusiato de sodio. Una pequeña cantidad de esta mezcla sólida se coloca en una superficie blanca y se añaden unas gotas de leche o de orina de la vaca, si el animal tiene cetosis se observa un color rosado que se intensifica a morado al aumentar los cuerpos cetónicos (Campos *et al.*, 2005; Brickner *et al.*,

III. 4. 1. Química seca

Actualmente se han realizado estudios tendientes a determinar el β -hidroxibutirato en muestras de leche, y acetoacetato en muestras de orina y leche. esto motivado por la facilidad en la obtención de muestras. Con dicho objeto se ha desarrollado un método semi cuantitativo, basado en química seca mediante el uso de cintas reactivas y polvo, en las que el β -hidroxibutirato de la muestra de leche o el acetoacetato en muestras de orina y leche reaccionan con los reactivos de la cinta, produciéndose una reacción de color cuya intensidad es proporcional a la concentración del β -hidroxibutirato o acetoacetato en la muestra, entregando de esta forma resultados en rangos aproximados (Carrier *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 2005; Brickner *et al.*, 2007).

Prueba tira reactiva β HBA p. ej., Keto-Test[®] (Elanco, Nagoya, Japón): es un análisis que se realiza para medir los niveles de β -hidroxibutirato únicamente en leche. Química del análisis: la almohadilla de la tira reactiva contiene una enzima que convierte el β -hidroxibutirato en acetoacetato. Esta reacción genera iones de hidrógeno (H^+) que reducen el azul de nitrotetrazolium en formazán, de color morado. Cuanto más oscuro sea el color morado, mayor es la concentración de β -hidroxibutirato (Campos *et al.*, 2005; Nielsen *et al.*, 2005; Brickner *et al.*, 2007).

Instrucciones de uso (Campos *et al.*, 2005; Nielsen *et al.*, 2005; Brickner *et al.*, 2007; Iwersen *et al.*, 2009):

1. Recoger la muestra de leche (de un cuarto o un *pool* de los cuatro); si las muestras de leche fueron refrigeradas, dejar que alcancen la temperatura ambiente o si la leche ha estado quieta durante cierto tiempo, asegurarse de mezclarla bien antes de realizar la prueba.
2. Sacar una tira reactiva del frasco y posteriormente cerrarlo herméticamente (las tiras reactivas son sensibles a la humedad); si las tiras reactivas fueron refrigeradas de 2 °C a



25 °C (36 °F a 77 °F) para su mejor conservación, se debe permitir que alcancen la temperatura ambiente antes de realizar la prueba.

3. Se debe evitar tocar la almohadilla de las tiras reactivas así como, usar las tiras que han cambiado de color después de estar guardadas durante un almacenamiento prolongado. La almohadilla de la tira reactiva sin usar debe ser de color amarillo.
4. Sumergir la almohadilla de la tira reactiva en la muestra.
5. Sacar la tira y agitarla para eliminar el exceso de leche.
6. Esperar un minuto y comparar el resultado con el (Cuadro 6); la cetosis subclínica se establece con valores de β-hidroxibutirato en leche superiores a 0.2 mM.

Cuadro 6. Interpretación de la concentración de β-hidroxibutirato en leche

Concentración Milimolar	Concentración Micromolar	Interpretación	Color
0 mM	0 μM	tira nueva	amarillo
0.01 a 0.099 mM	10 a 99 μM	normal (-)	café claro
0.1 a 0.199 mM	100 a 199 μM	cuestionable (+/-)	morado claro
0.2 a 0.499 mM	200 a 499 μM	positivo (+)	morado
0.5 a 1.0 mM	500 a 1000 μM	positivo (++)	morado fuerte

1 - mol: unidad fundamental del Sistema Internacional de Unidades que mide el peso molecular de una sustancia (p.ej., átomos, moléculas, iones, electrones, radicales u otras partículas) expresado en gramos

2 - milimolar 10^{-3} mol/L.

3 - micromolar 10^{-6} mol/L.

Fuente: Elaboración propia a partir de (Carrier *et al.*, 2004; Campos *et al.*, 2005; Nielsen *et al.*, 2005; Brickner *et al.*, 2007; Iwersen *et al.*, 2009).

Prueba tira reactiva AcAc p. ej., KetoStix® (Bayer, Etobicoke, Ontario): es un análisis que se realiza por medio de tiras reactivas para medir los niveles de acetoacetato en orina (Campos *et al.*, 2005; Iwersen *et al.*, 2009). La química del análisis y las instrucciones de uso son muy similares a las tiras reactivas para β-hidroxibutirato en leche, pero la interpretación de sus

resultados es distinta (Cuadro 7), la cetosis subclínica se establece con valores de acetoacetato en orina superiores a 1.47 mM.

Cuadro 7. Interpretación de la concentración de acetoacetato en orina

Concentración Milimolar	Concentración Micromolar	Interpretación	Color
0.49 mM	490 μ M	traza	amarillo
1.47 mM	1470 μ M	chica	café claro
3.94 mM	3940 μ M	moderada	violeta claro
7.84 mM	7840 μ M	grande	violeta
15.7 mM	15700 μ M	muy grande	violeta fuerte

Fuente: Elaboración propia a partir de (Carrier *et al.*, 2004, Campos *et al.*, 2005; Nielsen *et al.*, 2005; Brickner *et al.*, 2007; Iwersen *et al.*, 2009)

Prueba polvo reactivo p. ej., PINK[®] milk ketone test (Butler, Dublín, OH): es un análisis que se realiza por medio de polvo para medir los niveles de acetoacetato en leche. El polvo se agrega a las muestras de leche y se debe asegurar que el reactivo se mezcle bien antes de interpretar la prueba (Campos *et al.*, 2005; Brickner *et al.*, 2007) (Cuadro 8), la cetosis subclínica se establece con valores de acetoacetato en leche superiores a 0.1 mM.

Cuadro 8. Interpretación de la concentración de acetoacetato en leche

Concentración Milimolar	Concentración Micromolar	Interpretación	Color
menos de 0.1 mM	menos de 100 μ M	negativo (-)	sin cambio
0.1 mM	100 μ M	cetosis subclínica (+)	rosa claro
más de 0.5 mM	más de 500 μ M	cetosis clínica (++)	rosa fuerte

Fuente: Elaboración propia a partir de (Carrier *et al.*, 2004, Campos *et al.*, 2005; Nielsen *et al.*, 2005; Brickner *et al.*, 2007; Iwersen *et al.*, 2009)

III. 4. 2. Perfil metabólico sanguíneo

Para evaluar el grado de movilización de grasa y la magnitud del desequilibrio energético, en la actualidad se emplean con bastante éxito los perfiles metabólicos, dados a conocer desde 1970

como un método de diagnóstico para detectar alteraciones metabólicas en hatos lecheros, producto de desequilibrios en el ingreso, circulación y egreso de los nutrientes al organismo; los metabolitos más significantes para conocer el balance energético y poder llegar a un análisis integral de la situación de la vaca al inicio de la lactancia son: β -hidroxibutirato, ácidos grasos no esterificados, colesterol y urea (Campos *et al.*, 2005; Dann *et al.*, 2005; Bauman *et al.*, 2006; Dann *et al.*, 2006; Ríos *et al.*, 2006; Correa y Carulla, 2009).

Instrucciones de uso:

1. Las muestras de sangre se recolectan a través de venopunción en la vena yugular o coccígea (10 mL de sangre extraída utilizando tubos al vacío sin anticoagulante) la misma hora del día, en ayunas y después del ordeño de la mañana.
2. Las muestras se enfrían a 4 °C y se transportan al laboratorio.
3. El suero se prepara por centrifugación (1600 x g durante 15 minutos a 4 °C).
4. Una vez separado el suero, éste es depositado en alícuotas y conservado en refrigeración y congelado a -20 °C para su posterior análisis en serie al final del período de recolección.
5. La concentración de colesterol, β -hidroxibutirato, ácidos grasos no esterificados y urea se determinan utilizando diferentes test de lectura:
 - β -hidroxibutirato mediante el método enzimático NAD⁺ dependiente (p. ej., Kit RANDOX, art. 1007).
 - Ácidos grasos no esterificados mediante el método enzimático colorimétrico (p. ej., Kit RANDOX, art. 115).
 - Colesterol mediante el método colesterol-oxidasa (p. ej., Kit Stambio, art. 1010).
 - Urea mediante el método ureasa/NADH (p. ej., Kit Roche, art. 1360604).
6. Las muestras se procesan en un analizador bioquímico semiautomático (p. ej., Microlab 200, Merck).

Los ácidos grasos no esterificados son indicadores más sensibles que la glucosa, para

establecer los desbalances de energía en el inicio de la lactancia en bovinos. La concentración de ácidos grasos no esterificados debe ser inferior a 0.33 mM equivalente a 330 μ M en el período seco fresco (primeras cuatro semanas desde el momento en que la vaca es secada), menor que 0.40 mM en el período seco preparto (cuatro últimas semanas antes del parto), y en la lactancia temprana inferiores a 700 μ M; valores superiores sugieren un desequilibrio energético en el animal, y han sido asociados con valores bajos en la concentración de colesterol. Niveles de glucemia inferiores a 3.0 mM se usan para clasificar a las vacas que padecen balance energético negativo (Bauman *et al.*, 2006; Correa y Carulla, 2009).

La detección de cetosis subclínica, se define por un nivel excesivo de cuerpos cetónicos circulantes con ausencia de signos clínicos. En los últimos años para discriminar entre vacas sanas y vacas afectadas por cetosis subclínica se han utilizado diferentes puntos de corte con respecto al β -hidroxibutirato sanguíneo, basándose en la producción y el deterioro de la salud de la vaca lechera: 1.2 mM (Geishauser *et al.*, 1998; van Kneegsel *et al.*, 2010), 1 mM (Sorribas *et al.*, 2002; Goldhawk *et al.*, 2009) ó 1.4 mM (Duffield *et al.*, 2009; Iwersen *et al.*, 2009).

El colesterol es un lípido anfipático, característica que le permite formar parte de la estructura de la membrana externa de las lipoproteínas de muy baja densidad, este lípido se almacena en los tejidos en forma de ésteres de colesterilo, y es el precursor de todos los demás esteroides del organismo, como corticosteroides, hormonas sexuales, ácidos biliares y vitamina D. Las vacas que han desarrollado una severa infiltración grasa en el hígado presentan una disminución en la concentración del colesterol asociado con las lipoproteínas de muy baja densidad. Lo anterior se debe a los desequilibrios energéticos propios de la etapa de transición entre el parto y el inicio de la lactancia; por lo que al analizar la colesterolemia entre vacas sanas 4.2 mM y vacas con cetosis 3.3 mM, se establece que la colesterolemia es un buen indicador del balance de energía después de alcanzar el pico de producción de leche, debiendo utilizarse otros indicadores para corroborar el estado de cetosis antes de este período (Dann *et al.*, 2005; Bauman *et al.*, 2006; Dann *et al.*, 2006; Rios *et al.*, 2006; Correa y Carulla, 2009).



III. 4. 3. Relación grasa: proteína como indicador de cetosis subclínica

La leche bovina está constituida en promedio por 87 % agua y 13 % de llamados sólidos lácteos que incluyen la grasa, las proteínas, la lactosa y los minerales. Las proteínas comprenden no sólo a la fracción proteica verdadera sino también la no proteica constituida por urea y amoníaco. La proteína verdadera está constituida a su vez por cantidades variables de distintos tipos de caseína (p. ej., α -1, α -2, β -2 y κ) y lactoalbúminas que pueden representar del 15 a 20 % de las proteínas. La fracción nitrogenada no proteica, principalmente la urea varía en función de la movilización de aminoácidos del tejido muscular y de la cantidad de proteína soluble y nivel de carbohidratos no estructurales en la dieta (Bobe *et al.*, 2004; Sánchez, 2006; Walsh *et al.*, 2007; Angulo *et al.*, 2009; Duffield *et al.*, 2009).

Los lípidos que predominan en la leche son fundamentalmente triacilglicérols (98 %) fosfolípidos (1 %), esterols (0.5 %) y el resto son glicolípidos, colesterol, ácidos grasos libres y vitaminas liposolubles. Los principales ácidos grasos constituyentes poseen entre 4 y 18 carbonos, siendo más abundante el mirístico (C14), el triacilglicérido más importante es el 1,2 dipalmitoil-3 butiroil glicérido (Bauman *et al.*, 2006; Dann *et al.*, 2006; Angulo *et al.*, 2009).

Tradicionalmente se ha visto a los datos sobre composición de leche (p. ej., grasa, proteína, conteo de células somáticas, etc.) como la base para evaluar genéticamente toros y establecer criterios para el pago de la leche a los productores. En los últimos años sin embargo, esos mismos datos son utilizados para identificar animales con problemas metabólicos, detectar posibles desbalances en las dietas y desarrollar estrategias de manejo por grupos de animales (Bobe *et al.*, 2004; Sánchez, 2006; Walsh *et al.*, 2007; Correa y Carulla, 2009; Duffield *et al.*, 2009).

Entre los factores que afectan la composición de la leche se encuentran los factores genéticos, la etapa de la lactancia, la edad del animal, el estado sanitario y el ambiente; tradicionalmente de un 55 a un 60 % de la variación observada se debe a factores genéticos (p. ej., razas y líneas genéticas dentro de una misma raza) y de un 40 a 45 % a factores ambientales, donde problemas en la alimentación indican una alteración en la relación normal entre ácido

acético y ácido propiónico en el rumen (Bobe *et al.*, 2004; Sánchez, 2006; Walsh *et al.*, 2007; Correa y Carulla, 2009; Duffield *et al.*, 2009).

Los valores normales de grasa se ubican en 3.6 % en la raza Holstein Friesian y 4.9 % en la raza Jersey; contenidos normales y esperables de proteínas totales suelen ubicarse en 3.08 % en Holstein Friesian y 3.8 % en Jersey, con contenidos esperables de lactosa de 4.6 y 4.8 % y el contenido de minerales totales con una participación en el rango de 0.72 a 0.74 % para todas las razas (Čejna y Chládek, 2005; Butchereit *et al.*, 2010) (Cuadro 9).

Cuadro 9. Valores normales de sólidos en leche

Componentes	Holstein Friesian	Jersey
% de grasa	3.6	4.9
% de proteína	3.08	3.8
% de lactosa	4.6	4.8
% de minerales	0.72 a 0.74	0.72 a 0.74
relación grasa: proteína	1.17 ⁽¹⁾	1.29

⁽¹⁾ relación grasa: proteína: por cada 1.17g de grasa producida en vacas Holstein Friesian, se produce 1g de proteína.

Fuente: Elaboración propia a partir de (Čejna y Chládek, 2005. Butchereit *et al.*, 2010)

La producción de grasa y proteína se encuentra elevada y positivamente correlacionada, con lo que el balance entre la proteína y la grasa es relativamente constante en vacas funcionando en forma normal. Cuando se presenta un exceso de carbohidratos y proteínas solubles en rumen que causan un aumento de protones y de amonio respectivamente, la producción de proteína se hace mayor que la producción de grasa, generando una inversión grasa: proteína o depresión en la grasa láctea (Bobe *et al.*, 2004; Sánchez, 2006; Walsh *et al.*, 2007; Correa y Carulla, 2009; Duffield *et al.*, 2009). Por el contrario, una relación grasa: proteína muy alta, es un indicador de balance energético negativo asociado a deficiencias en carbohidratos no estructurales. Por lo que la cetosis subclínica propia de la lactancia temprana sugiere una alteración de la relación grasa: proteína en leche, debido a una disminución en la producción de proteína láctea a causa de una reducción en el suministro de energía y un incremento en la producción de grasa láctea, ocasionado por la mayor disponibilidad de β -hidroxibutirato y ácidos grasos libres, producidos por el catabolismo de los lípidos corporales (Gantner *et al.*, 2009; Butchereit *et al.*, 2010).



IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La carencia de un estudio que cuantifique la relación entre el β -hidroxibutirato sanguíneo y la producción de grasa y proteína de leche durante la lactancia temprana; así como la posibilidad de utilizar esta asociación, para generar modelos discriminatorios que permitan monitorear el β -hidroxibutirato sanguíneo y estimar la presencia de cetosis subclínica no como una prueba de diagnóstico individual, sino como una herramienta para el diagnóstico del hato.

V. OBJETIVOS

V. 1. General

Evaluar a través de un estudio transversal durante la lactancia temprana, si el β -hidroxibutirato sanguíneo se relaciona con la producción de grasa y proteína de leche.

V. 2. Particulares

- Investigar la magnitud y el sentido de asociación en cuanto a:
 - β -hidroxibutirato – grasa por hato.
 - β -hidroxibutirato – proteína por hato.
 - β -hidroxibutirato – relación grasa: proteína.
- Definir la asociación en términos de una ecuación matemática.
- Generar un modelo para monitorear la concentración del β -hidroxibutirato sanguíneo.
- Generar un modelo para estimar la presencia de cetosis subclínica.

VI. HIPÓTESIS

Si durante la lactancia temprana el β -hidroxibutirato sanguíneo está en función de la producción de grasa y proteína de leche; entonces a partir de esa relación es factible monitorear el β -hidroxibutirato sanguíneo y estimar la presencia de cetosis subclínica en el hato.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

VII. 1 Trabajo de campo

VII. 1. 1. Colecta de las muestras de leche

Los procedimientos realizados con las vacas seleccionadas siguieron las directrices del Canadian Council on Animal Care (CCAC). Se trabajó con 59 hatos ubicados en Québec Canadá, registrados en Dairy Production Centre of Expertise for Québec and the Atlantic (VALACTA), durante el período comprendido entre los meses de septiembre del año 2011 a mediados de marzo del año 2012.

Las vacas fueron seleccionadas a partir de sus registros: a) por composición racial: más del 85 % del grupo genético Holstein Friesian, b) en lactancia temprana, c) por producción de leche: más de 8000 kg anuales por vaca y d) por número de lactancia: segundo y tercer parto. Este patrón de selección fue debido a que estudios previos identificaron un incremento en la cetosis subclínica con el aumento del número de partos, localizando la mayor prevalencia en el segundo y tercer parto (Duffield *et al.*, 2009).

De cada hato se colectaron 10 muestras de leche-una por vaca durante el ordeño de la mañana en frascos de 100 mL con tapa, previamente identificados con el número de registro del animal. Las vacas seleccionadas en cada hato se estandarizaron de acuerdo a su día de lactancia para lograr una homogeneidad en las muestras individuales, posteriormente se formaron 59 muestras combinadas, una por cada hato con volúmenes colectivos de 100 mL cada uno y se registró la media de producción de leche del grupo. Inmediatamente después del mezclado invirtiendo 10 veces cada muestra combinada de leche, se utilizó Bronopol (0.04 g/100 mL; Broad Spectrum Microtabs II: D&F Control Systems, Inc., Dublin, CA) como método de conservación (Sánchez *et al.*, 2005) y se almacenó a 4 °C para su posterior análisis en serie al final del período de colección.

VII. 1. 2. Colecta de las muestras de sangre

Las muestras de sangre fueron colectadas por punción en la vena coccígea utilizando tubos al vacío sin anticoagulante previamente identificados con el número de registro y hato de la vaca,

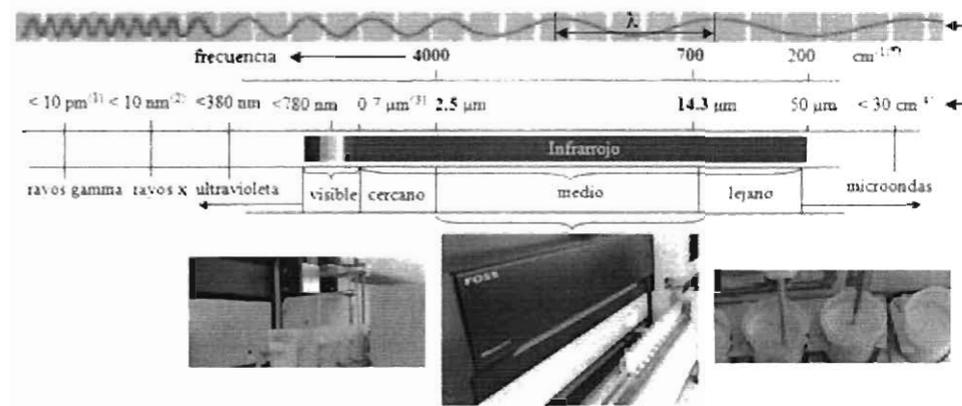


aunque el β -hidroxibutirato es el metabolito más estable de las cetonas presenta variaciones asociadas con el consumo de alimento (LeBlanc, 2010) por lo que todas las muestras se colectaron siempre a la misma hora del día, en ayunas y después del ordeño de la mañana. La sangre se enfrió a 4 °C y se transportó al laboratorio del Departamento de Biomedicina Veterinaria en la Universidad de Montreal en Québec Canadá, para formar los respectivos *pools* (alícuotas de 10 mL cada una, de 10 muestras individuales estandarizadas igual que con la leche) para la detección del estado metabólico del hato como lo describe van Saun (2006), el suero se preparó por centrifugación a 1500 x g durante 20 min a 4 °C y cada muestra se congeló a -20 °C hasta su análisis.

VII. 2 Trabajo de laboratorio

VII. 2. 1. Espectrofotometría en el infrarrojo por transformada de Fourier (FTIV)

Las muestras de leche se atemperaron hasta alcanzar 37 °C a baño María y se analizaron para determinar la concentración de grasa y proteína con equipo MilkoScan (Foss Electric., Hillerød, Denmark), que trabaja con la región infrarroja media del espectro electromagnético (Figura 18) cubriendo fotones con una longitud de onda de 2.5 a 14.3 μm y con una frecuencia en el número de veces que vibra su onda de 4000 y 700 cm^{-1} respectivamente (FOSS, 2011).

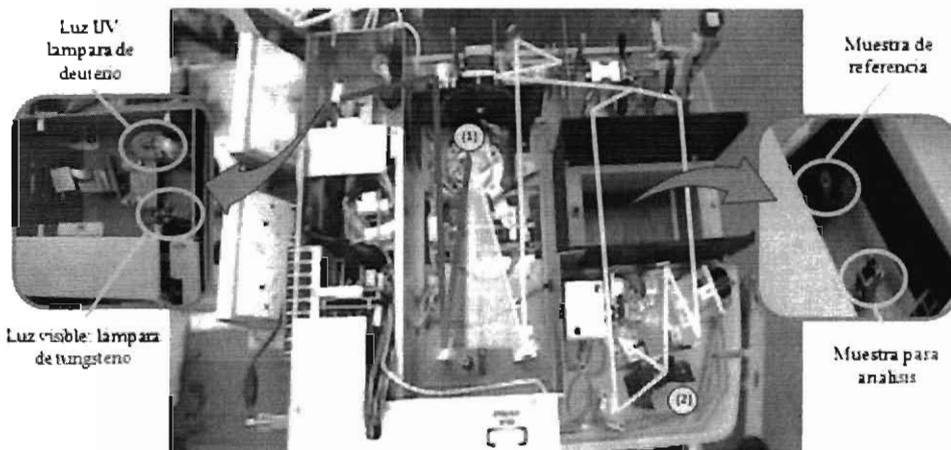


⁽¹⁾ Picómetro: 1×10^{-12} m; ⁽²⁾ Nanómetro: 1×10^{-9} m; ⁽³⁾ Micrómetro: 1×10^{-6} m; ⁽⁴⁾ Centímetro, centésima parte de un metro; ⁽⁵⁾ ciclos por centímetro: unidad de magnitud que indica la frecuencia con que vibra una onda en un centímetro; ⁽⁶⁾ letra griega λ (longitud de onda).

Fuente: Elaboración propia a partir de (FOSS, 2011).

Figura 18. Región infrarroja del espectro electromagnético cubierta por MilkoScan

El MilkoScan envió un haz de luz por diferentes espejos hasta atravesar un monocromador (Figura 19) que dividió la luz blanca proveniente de una lámpara de tungsteno en su banda de longitudes de onda seleccionando el rayo de luz infrarrojo, posteriormente éste fue separado en dos rayos, uno atravesó a cada una de las muestras de leche, y el otro atravesó por una muestra de referencia, registrándose la cantidad de fotones absorbidos en cada longitud de onda y la promoción subsiguiente del electrón o electrones desde un nivel de energía a otro (van Kneegsel *et al.*, 2010), posteriormente se escaneó el espectro electromagnético mediante la transformada de Fourier, que descompuso la señal periódica en una suma de senos y cosenos formando una base de datos, a partir de la cual, la transformada de Fourier cambió las amplitudes de onda a frecuencias permitiendo hacer múltiples lecturas de una sola muestra y conocer las frecuencias contenidas en todos los tiempos en que existió la señal de manera simultánea. De esta manera el MilkoScan trazó el espectro de absorción, e identificó la cantidad de radiación absorbida, la longitud de onda, la forma del espectro y el tipo de enlaces químicos presentes, (Rutten *et al.*, 2009).



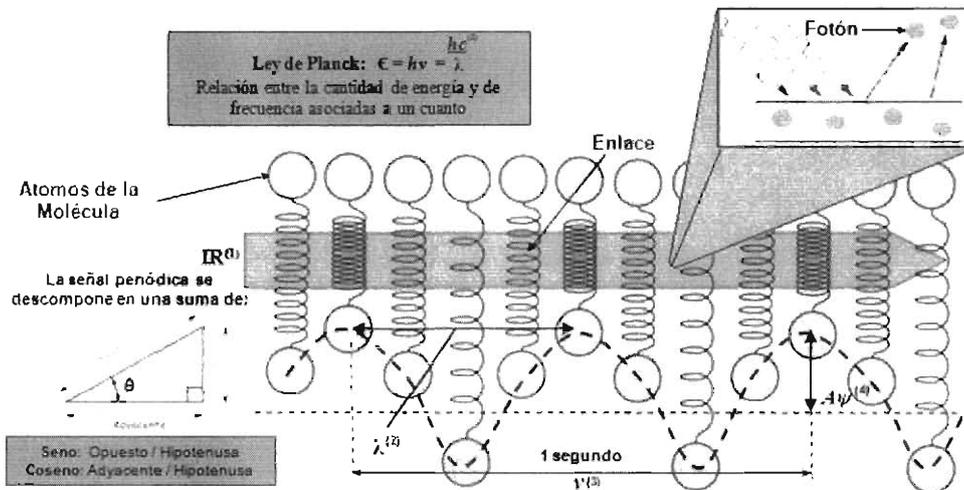
(1) Monocromador; (2) Fotodetector

Fuente: Elaboración propia a partir de (FOSS, 2011).

Figura 19. Principio técnico del espectrofotómetro de absorción de luz infrarroja

El principio óptico del sistema de medición del espectrofotómetro contenido en el MilkoScan, se basó en el hecho de que la luz se comporta como partículas de energía independientes (fotones) cuando interacciona con la materia para transferir una cantidad fija de

energía (Figura 20), por tal motivo toma valores discretos más que continuos (Rutten *et al.*, 2009; van Kneysel *et al.*, 2010). Los intervalos más pequeños entre los valores discretos son llamados cuanto o *Quantum* en latín y su energía está dada por la Constante de Planck (h) = 6.626 X 10⁻³⁴ julios por segundo y la frecuencia (ν) (van Kneysel *et al.*, 2010).



⁽¹⁾ rayo de luz infrarrojo; ⁽²⁾ letra griega λ (longitud de onda) es la distancia de un máximo de la onda al siguiente, ⁽³⁾ letra griega ν (frecuencia) es la cantidad de máximos de onda que pasan por un punto fijo por una unidad de tiempo, se expresa en segundos recíprocos s⁻¹ o hertz, Hz, ⁽⁴⁾ amplitud. es la altura de una onda, medida desde el punto medio hasta el máximo.

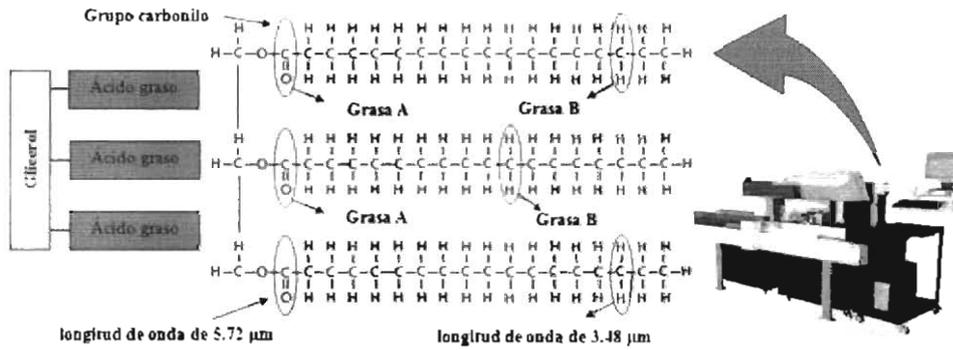
Fuente: Elaboración propia a partir de (Rutten *et al.*, 2009, van Kneysel *et al.*, 2010)

Figura 20. Principio óptico del sistema de medición del espectrofotómetro contenido dentro del MilkoScan™ FT+

El equipo MilkoScan se basó en dos longitudes de onda o filtros para grasa:

1. Grasa A: la absorción se debió a las vibraciones de estirado en los enlaces (>C=O) del grupo carbonilo presentes en los ésteres con una longitud de onda de 5.72 μm . (Figura 21) (FOSS, 2011). Por tanto, este filtro cuantificó el número de moléculas de grasa con independencia de la longitud y el peso de los ácidos grasos individuales.
2. Grasa B: la absorción se debió a las vibraciones de estirado en los enlaces (C-H) de las cadenas de ácidos grasos con una longitud de onda de 3.48 μm . (Figura 21) (FOSS,

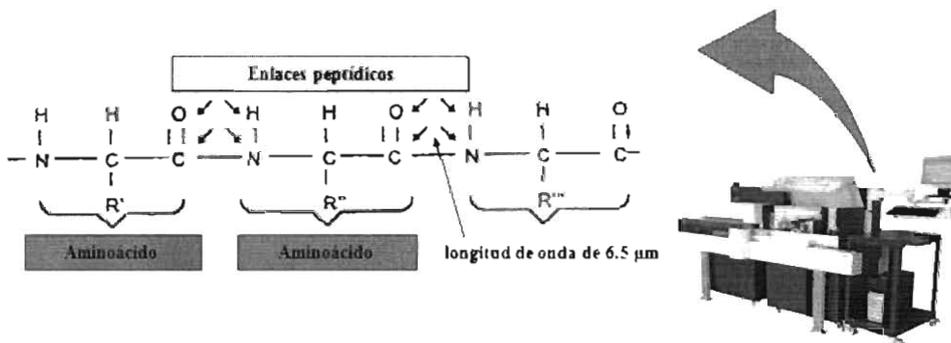
2011). Por tanto, este filtro cuantificó la longitud de la cadena por el número de enlaces donde se absorbió la luz y la cantidad de moléculas de ácidos grasos.



Fuente: Elaboración propia a partir de (FOSS, 2011).

Figura 21. Filtros del MilkoScan™ FT+ para grasa

La molécula de proteína está formada por aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos (Rutten *et al.*, 2009). La absorción se debió a las vibraciones de estirado en los enlaces (-CO-NH-) de los enlaces peptídicos, con una longitud de onda de 6.5 μm (Figura 22) (FOSS, 2011). Por tanto, este filtro cuantificó el número de moléculas de proteína junto con la concentración de los aminoácidos individuales por el número de enlaces presentes en la muestra.



Fuente: Elaboración propia a partir de (FOSS, 2011)

Figura 22. Filtro del MilkoScan™ FT+ para proteína

Posteriormente, el MilkoScan identificó el porcentaje de grasa y proteína por interpolación del espectro de absorbancia de las muestras de leche, con una curva de calibración previamente estandarizada para grasa y proteína almacenada en la memoria del equipo. Los métodos de referencia utilizados son: Röse Gottlieb para grasa y Kjeldahl para proteína (FOSS, 2011).

Con el fin de monitorear el estado metabólico del hato, representa una mayor utilidad técnica conocer el desgaste productivo de la ubre, en comparación con la cantidad de grasa y proteína por cada kg de leche, por lo que se calcularon los kg producidos de grasa y proteína totales por hato, tomando en cuenta la concentración de grasa y proteína por kg de leche y la media de producción de leche del grupo de cada *pool*, los modelos adoptaron las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned} \text{kg de grasa por hato} &= \text{concentración de grasa por kg de leche} \times \text{kg de leche producida} \\ \text{kg de proteína por hato} &= \text{concentración de proteína por kg de leche} \times \text{kg de leche producida} \end{aligned}$$

VII. 2. 2. Método enzimático NAD⁺ dependiente

Las alícuotas con el suero se atemperaron hasta alcanzar 37 °C a baño María y se analizaron para determinar la concentración de β-hidroxiacetato en μM, mediante el método enzimático NAD⁺ dependiente con el Kit art. 1007, RANDOX (Cuadro 10) (RANDOX, 2009).

Cuadro 10. Materiales suministrados en el Kit art. 1007, RANDOX

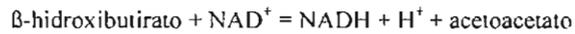
Componentes	Composición del reactivo	Concentraciones iniciales de las soluciones
Tampón, pH 8.5	Tampón tris	100 mM
	EDTA ⁽¹⁾	2 mM
	Ácido oxálico	20 mM
Enzima/Coenzima	NAD ⁺ (²)	2.5 mM
	β-HBDH(³)	0.12 UI/mL(⁴)
Patrón	β-hidroxiacetato	1.0 mM

⁽¹⁾ ácido Etilendiaminotetraacético, ⁽²⁾ Dinucleótido de nicotinamida y adenina, ⁽³⁾ β-hidroxiacetato deshidrogenasa,

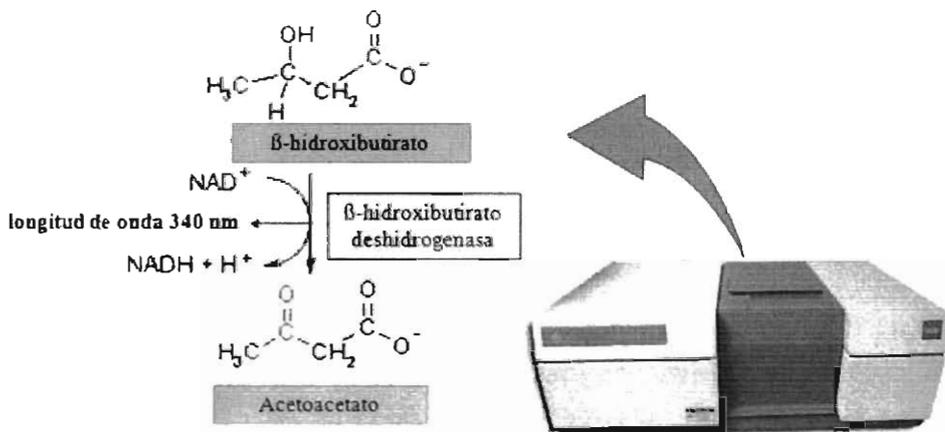
⁽⁴⁾ unidades internacionales por mililitro.

Fuente: Elaboración propia a partir de (RANDOX, 2009).

El método enzimático NAD^+ dependiente se basó en la acción de la enzima β -hidroxibutirato deshidrogenasa en la oxidación del β -hidroxibutirato (Figura 23):



Tanto el NAD^+ como el NADH absorben luz ultravioleta, el pico de absorción del NAD^+ se encuentra en una longitud de onda de 259 nm y el pico de absorción del NADH se encuentra en una longitud de onda de 339 nm (RANDOX, 2009). Esta diferencia en el cambio de absorbancia, entre las formas oxidada y reducida, está en relación directa con la concentración de β -hidroxibutirato por lo que se cuantificó su absorción en el ultravioleta a 340 nm (RANDOX, 2009) mediante un espectrofotómetro (Coulter Dacos Biochemistry Analyzer; Coulter, Hialeah, FL) por interpolación del espectro de absorbancia de las muestras de suero con una curva de calibración previamente estandarizada con el patrón que incluye el Kit RANDOX, art. 1007 con el β -hidroxibutirato 1.0 mM.



Fuente: Elaboración propia a partir de (RANDOX, 2009)

Figura 23. Oxidación de β -hidroxibutirato a acetoacetato por acción de la enzima β -hidroxibutirato deshidrogenasa

VII. 3. Trabajo de gabinete

Para el tratamiento de los datos obtenidos se utilizó el programa estadístico (SAS, Institute Inc. 2001) (versión 8.2, Cary, NC) (Anexo 1 y 2). Los resultados cuantitativos se expresaron en forma



de media aritmética, desviación estándar, valores mínimos y máximos y distribución normal. Para cuantificar la magnitud y el sentido de asociación entre las variables estudiadas, se realizó un modelo de regresión lineal (PROC REG; SAS, 2001) cuya significación estadística se manifestó por el Coeficiente de Correlación de Pearson (PROC CORR; SAS, 2001) y un valor ($P < 0.05$).

La forma geométrica de la nube de puntos pertenecientes a una regresión lineal, puede ser descrita por un elipsoide. La localización, forma y tamaño de la elipse refleja la media, varianza y covarianza de las observaciones; sin embargo, cuando los valores atípicos (Outlier) están presentes en los datos, la matriz de varianza-covarianza se extiende hacia ellos y los primeros componentes principales serán dirigidos a estos puntos en la periferia. Por consiguiente, el vector no definirá adecuadamente la dirección del modelo de regresión; a la par de esta situación, en la distancia Euclídiana se presenta el problema de que las variables pueden estar correlacionadas entre sí, ocasionando un efecto de redundancia (Friendly, 2008). Por lo que los valores atípicos se determinaron mediante el Macro (ROBUST MULTIVARIATE OUTLIER DETECTION; SAS, 2001) que calcula la distancia robusta de Mahalanobis para cada observación (Friendly, 2008), este Macro toma en cuenta las correlaciones entre las variables y la variabilidad de clases mediante la fórmula:

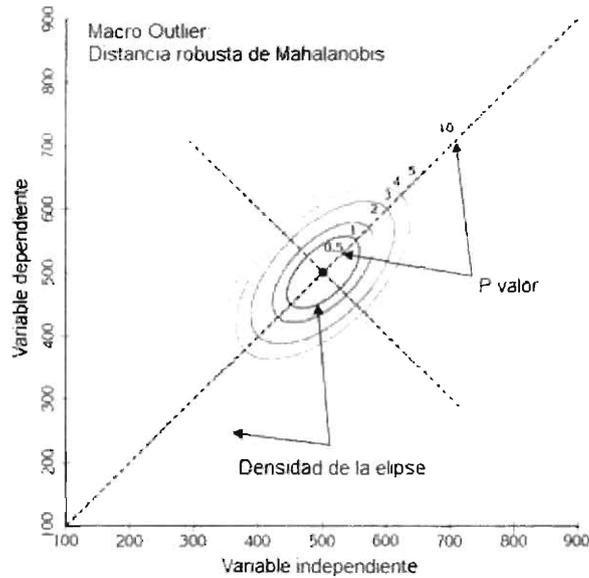
$$d_m(x, \bar{x}) = \sqrt{(x - \bar{x})' \Sigma_r^{-1} (x - \bar{x})}$$

donde:

- $d_m(x, \bar{x})$ = distancia robusta de Mahalanobis;
- x = vector de la observación que se quiere medir;
- \bar{x} = vector de la media de las observaciones; y
- Σ_r^{-1} = matriz de varianza-covarianza de las observaciones.

El Macro Outlier asigna un peso a las observaciones cuyo valor tiene probabilidad de ser (χ^2) $< P$ donde las observaciones con menor varianza tienen más importancia que las de mayor varianza. El programa editor del Macro permite modificar el valor asignado a P . (PVALUE = 0.05, 0.5, 1, 2, 3... y hasta 10) alterando la forma y tamaño de la elipse de acuerdo a su matriz de

varianza-covarianza (Figura 24). De manera simultánea permite modificar el número de pasos o repeticiones a través de los datos para realizar recortes multivariados consecutivos que separen a los potenciales valores atípicos de la base de datos.



Fuente: Elaboración propia a partir de (Friendly, 2008)

Figura 24. Modificación en la densidad de la elipse: Macro Outlier, distancia robusta de Mahalanobis

La variable concentración de β -hidroxibutirato en suero, fue la que más variación mostró en sus valores, por lo que para mejorar la distribución normal de sus residuales fue necesario transformarla a su función logarítmica natural: \ln del β -hidroxibutirato. Para examinar la posibilidad de estimar la concentración del β -hidroxibutirato a través de sus variables asociadas, los modelos estadísticos adoptaron las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned} \ln(\beta\text{-HBA}) &= \alpha + \beta_1 * \text{kg de grasa por hato} + e_i \\ \ln(\beta\text{-HBA}) &= \alpha + \beta_1 * \text{kg de proteína por hato} + e_i \\ \ln(\beta\text{-HBA}) &= \alpha + \beta_1 * \text{relación grasa: proteína} - e_i \end{aligned}$$



donde:

$\ln(\beta\text{-HBA})$ = logaritmo natural del β -hidroxibutirato en suero;

α = intercepto al eje Y ;

β_j = coeficiente estimador; y

e_i = error estándar de la estimación: diferencias entre lo que postula el modelo y lo que se observa.

Se revisaron los principales supuestos para cada modelo de regresión (PROC UNIVARIATE; SAS, 2001). La forma funcional lineal se comprobó visualmente con una gráfica, la normalidad de los residuales o errores se verificó mediante la prueba Shapiro-Wilk e histograma, la Homocedasticidad se confirmó visualmente con una gráfica que comparó la varianza de los valores residuales frente a los valores previstos y se verificó la no auto correlación de los residuales mediante la prueba de Durbin-Watson.

Para describir la relación entre la variable de respuesta dicotómica ($Y = 0/1$; ausencia de cetosis subclínica / presencia de cetosis subclínica) con la variable explicativa continua: relación grasa: proteína y discriminar entre hatos sanos y hatos afectados por cetosis subclínica se fijó un punto de corte crítico a 1 mM de β -hidroxibutirato sanguíneo de acuerdo a (Sorribas *et al.*, 2002; Goldhawk *et al.*, 2009) y diez puntos de corte profiláctico entre 0.9 y 1 mM para identificar el mejor punto de corte para el modelo de regresión logística (PROC LOGISTIC, SAS, 2001).

Puesto que la verosimilitud es un número muy pequeño (comprendido entre 0 y 1) el modelo de regresión logística utilizó la siguiente ecuación basada en el logaritmo neperiano de la verosimilitud (Schiaffino *et al.*, 2003) para cuantificar hasta qué punto el modelo se ajustó bien a los datos:

$$[P/(1 - P)] = \exp(\beta_0 + \beta^T x)$$

donde:

P = probabilidad de que un hato con variable explicativa continua x se clasifique con cetosis subclínica;

β_0 = intercepto al eje Y ;

β^T = estimador de máxima verosimilitud de la variable explicativa continua x . y

x = variable explicativa continua: relación grasa: proteína

Posteriormente, se estableció un intervalo de confianza al 95 % para el vector del estimador de máxima verosimilitud β^T y se cuantificó el exceso o defecto de ventaja sobre la probabilidad (*odds ratio*, OR) que tienen los hatos expuestos a una modificación en la relación grasa: proteína de presentar cetosis subclínica frente a no padecerla.

Schiaffino *et al.* (2003) establecieron que existe una relación directa entre el estimador de máxima verosimilitud β^T y el OR. Esto significa que el β^T en regresión logística se expresa en función del logaritmo neperiano del exceso o defecto de ventaja sobre la probabilidad:

$$\ln(\text{odds}) = (\beta^T)$$

donde:

\ln = logaritmo neperiano de la verosimilitud;

odds = exceso o defecto de ventaja sobre la probabilidad;

p = probabilidad de presentar de cetosis subclínica; y

q = probabilidad de ausencia de cetosis subclínica.

El programa (PROC LOGISTIC; SAS, 2001) calculó la OR para relación grasa: proteína simplificando la ecuación al eliminar el \ln mediante la elevación de los parámetros estimados, a la potencia del estimador de máxima verosimilitud β^T para la relación grasa: proteína:

$$\ln(p/q) = \text{OR} = \text{Exp}(\beta^T)$$

donde:

\ln = logaritmo neperiano de la verosimilitud;

p = probabilidad de presentar de cetosis subclínica;

q = probabilidad de ausencia de cetosis subclínica;

OR = exceso o defecto de ventaja sobre la probabilidad; y

β^T = estimador de máxima verosimilitud para la relación grasa: proteína.

Por último se revisó en qué medida el modelo se ajustó a los datos por asociación de probabilidades previstas y respuestas observadas determinando la sensibilidad o razón de verdaderos positivos, especificidad o razón de verdaderos negativos, falsos positivos o error de tipo I, falsos negativos o error de tipo II y el área bajo la característica operativa del receptor (curva ROC) de acuerdo a (Schiaffino *et al.*, 2003) mediante las siguientes formulas:

$$VPR = 100 * Y = 1_{correct} / (Y = 1_{correct} + Y = 0_{incorrect})$$

donde:

VPR = sensibilidad o razón de verdaderos positivos;

$Y = 1_{correct}$ = presencia de cetosis subclínica clasificada correctamente; y

$Y = 0_{incorrect}$ = ausencia de cetosis subclínica clasificada incorrectamente.

$$SPC = 100 * Y = 0_{correct} / (Y = 0_{correct} + Y = 1_{incorrect})$$

donde:

SPC = especificidad o razón de verdaderos negativos;

$Y = 0_{correct}$ = ausencia de cetosis subclínica clasificada correctamente; y

$Y = 1_{incorrect}$ = presencia de cetosis subclínica clasificada incorrectamente.

$$FP = 100 * Y = 1_{incorrect} / (Y = 1_{correct} + Y = 1_{incorrect})$$

donde:

FP = falsos positivos o error de tipo I;

$Y = 1_{incorrect}$ = presencia de cetosis subclínica clasificada incorrectamente; y

$Y = 1_{correct}$ = presencia de cetosis subclínica clasificada correctamente.

$$FN = 100 * Y = 0_{incorrect} / (Y = 0_{correct} + Y = 0_{incorrect})$$

donde:

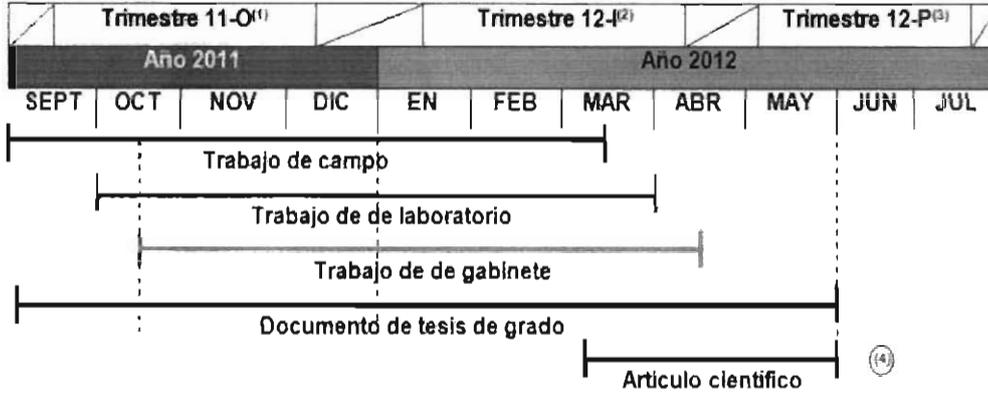
FN = falsos negativos o error de tipo II;

$Y = 0_{incorrect}$ = ausencia de cetosis subclínica clasificada incorrectamente; y

$Y = 0_{correct}$ = ausencia de cetosis subclínica clasificada correctamente.

VIII. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

El trabajo de campo tuvo una duración de 6 meses y medio, abarcando de septiembre del año 2011 a mediados de marzo del año 2012, el trabajo de laboratorio cubrió el período comprendido entre el mes de octubre del año 2011 a principios de abril del año 2012 y para el caso del trabajo de gabinete éste cubrió de mediados del mes de octubre del año 2011 a mediados de abril del año 2012 (Figura 25).



⁽¹⁾ 19 de septiembre al 13 de diciembre del año 2011, ⁽²⁾ 16 de enero al 10 de abril del año 2012, ⁽³⁾ 7 de mayo al 27 de julio del año 2012; ⁽⁴⁾ acuse de recibo de artículo enviado a la revista del padrón de excelencia de Conacyt o en el Institute for Scientific Information (ISI)

Fuente: Elaboración propia

Figura 25. Cronograma de actividades



IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los hatos seleccionados mostraron una media y desviación estándar de 78 ± 24 días en lactancia con valores máximos de 152 y mínimos de 19 días (Cuadro 11) ubicándolos dentro de la lactancia temprana, con una media y desviación estándar de 33.21 ± 4.04 kg/día para su producción de leche.

Cuadro 11. Características de los hatos en estudio, n = 59 hatos

Variable	Media	Desv Esta ^(a)	Mínimo	Máximo	Normalidad ^(b)
No_DL ⁽¹⁾ , días	78	24	19	152	0.53
PROD_LECH_HATO ⁽²⁾ , kg/día	33.21	4.04	22.90	39.92	0.02
β HBA ⁽³⁾ , μ M	778.51	1.69	553.65	1329.15	SN
ln del β HBA ⁽⁴⁾	6.63	0.19	6.31	7.19	0.03
PROD_GRAS_HATO ⁽⁵⁾ , kg/día	1.25	0.15	0.85	1.53	0.08
PROD_PROT_HATO ⁽⁶⁾ , kg/día	1.05	0.12	0.76	1.24	0.06
RGP ⁽⁷⁾ , g de grasa/g de proteína	1.19	0.06	1.07	1.37	0.07

⁽¹⁾ número de días en lactancia, ⁽²⁾ producción de leche por hato, ⁽³⁾ concentración de β -hidroxibutirato en suero; ⁽⁴⁾ logaritmo natural del β -hidroxibutirato en suero, ⁽⁵⁾ producción de grasa por hato, ⁽⁶⁾ producción de proteína por hato; ⁽⁷⁾ relación grasa: proteína. ^(a) Desviación Estándar; ^(b) prueba Shapiro-Wilk, SN = sin distribución normal $P > 0.005$

Una adaptación exitosa durante el posparto conduce a una lactancia temprana sana y productiva, mientras que una respuesta de adaptación deficiente puede conducir a una multitud de problemas metabólicos, como cetosis subclínica y alteración de los componentes de la leche. Uno de los indicadores para una respuesta adaptativa deficiente, es el aumento de las concentraciones de cuerpos cetónicos circulantes (LeBlanc, 2010). En este sentido, los 59 *pools* de suero analizados mostraron una media y desviación estándar de 778.51 ± 1.69 μ M de β -hidroxibutirato, con valores máximos de 1329.15 y mínimos de 553.65 μ M (Cuadro 11).

La utilización de cuerpos cetónicos por las células del organismo, es una función normal en el metabolismo de los hatos lecheros; sin embargo, la capacidad individual para manejar elevadas concentraciones de cetonas puede variar de una vaca a otra. La definición de un caso de cetosis subclínica en la vaca lechera se establece como presencia en la circulación de un nivel

excesivo de cuerpos cetónicos con ausencia de signos clínicos. En los últimos años para discriminar entre vacas sanas y vacas afectadas por cetosis subclínica se han utilizado diferentes puntos de corte con respecto al β -hidroxibutirato sanguíneo, basándose en la producción y el deterioro de la salud de la vaca lechera: 1.2 mM (Geishauser *et al.*, 1998; van Knegsel *et al.*, 2010), 1 mM (Sorribas *et al.*, 2002; Goldhawk *et al.*, 2009) ó 1.4 mM (Duffield *et al.*, 2009; Iversen *et al.*, 2009). En base a estas referencias los valores máximos registrados en el estudio, sugieren el riesgo de una reducción en el rendimiento de leche durante la lactancia temprana. Duffield *et al.* (2009) confirmaron esta afirmación y establecieron una reducción en la producción lechera de 1.88 kg/día con valores cercanos a 1.4 mM de β -hidroxibutirato en suero.

Las muestras de leche mostraron una media y desviación estándar de 1.25 ± 0.15 kg/día para la producción de grasa láctea por hato, con valores mínimos de 0.85 kg/día y valores máximos de 1.53 kg/día. Con respecto a la producción de proteína láctea por hato se registró una media y desviación estándar de 1.05 ± 0.12 kg/día, con valores mínimos de 0.76 kg/día y valores máximos de 1.24 kg/día.

En relación a estos valores Gantner *et al.* (2009) y Buttchereit *et al.* (2010) establecieron que con el fin de compensar el déficit energético propio de la lactancia temprana, se genera una oxidación incompleta de sustratos gluconeogénicos endógenos como triacilglicérols corporales, elevando la concentración de grasa en leche por un incremento en la disponibilidad de β -hidroxibutirato y ácidos grasos libres y reduciendo ligeramente el porcentaje de proteína en leche a causa de una reducción en el suministro de energía. En base a estas referencias los valores registrados confirman adaptaciones bioquímicas en el organismo de las vacas para garantizar su producción láctea.

El Cuadro 12 muestra las ecuaciones de regresión lineal que describen la variación del ln del β -hidroxibutirato durante la lactancia temprana. Los resultados indican que la producción de grasa por hato, no presentó asociación estadística con el ln del β -hidroxibutirato ($P > 0.10$), por su parte la producción de proteína por hato mostró un Coeficiente de Correlación de Pearson negativo ($r = -0.25$) lo que sugiere que la producción de proteína por hato se reduce ligeramente mientras el ln del β -hidroxibutirato aumenta progresivamente.



Cuadro 12. Ecuaciones de regresión lineal que describen la variación en el ln del β -hidroxibutirato durante la lactancia temprana, n = 59 hatos

Modelo	R ²	r	P-valor ⁽²⁾
$\ln(\beta\text{-HBA})^{(1)} = 6.59 + 0.03 * \text{kg de grasa por hato} + 0.17$	0.00	0.02	NS
$\ln(\beta\text{-HBA}) = 7.05 - 0.40 * \text{kg de proteína por hato} + 0.19$	0.06	-0.25	0.0496
$\ln(\beta\text{-HBA}) = 4.20 + 2.02 * \text{relación grasa. proteína} + 0.31$	0.42	0.65	< 0.001

⁽¹⁾ logaritmo natural del β -hidroxibutirato. ⁽²⁾ probabilidad de asociación estadísticamente significativa NS = no significativo $P > 0.10$

La asociación estocástica entre la relación grasa: proteína de leche y el ln del β -hidroxibutirato, cubre el supuesto de forma funcional lineal (Figura 26). El modelo presentó una relación media, R² expresado en porcentaje = 42 ($P < 0.001$) con un Coeficiente de Correlación de Pearson positivo ($r = 0.65$) lo que sugiere que la relación grasa: proteína se incrementa progresivamente conforme el ln del β -hidroxibutirato también aumenta.

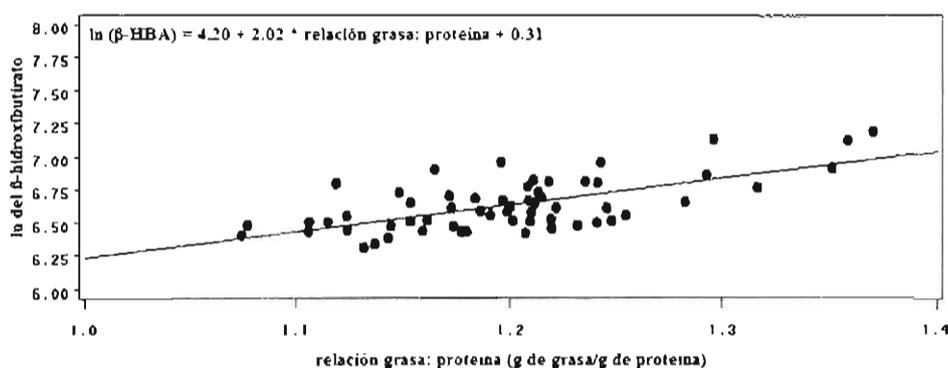


Figura 26. Relación entre el ln del β -hidroxibutirato y la relación grasa: proteína de leche. ln del β -hidroxibutirato (●); respuesta pronosticada (—)

El modelo ln del β -hidroxibutirato y la relación grasa: proteína de leche presentó $P < W = 0.05$ como valor estadístico para la prueba de Shapiro-Wilk, por lo tanto, de acuerdo a su proximidad a 0.5 se establece que se cubre el supuesto de normalidad para sus residuales (Figura

27), presentó 1.97 como valor estadístico para la prueba de Durbin-Watson, por lo tanto, de acuerdo a su proximidad a 2 se establece la no auto correlación de los residuales. Con respecto a la Homocedasticidad, se observó que la varianza de los errores estocásticos para cada modelo de regresión fue la misma para cada observación (Figura 28) cubriendo el supuesto del modelo.

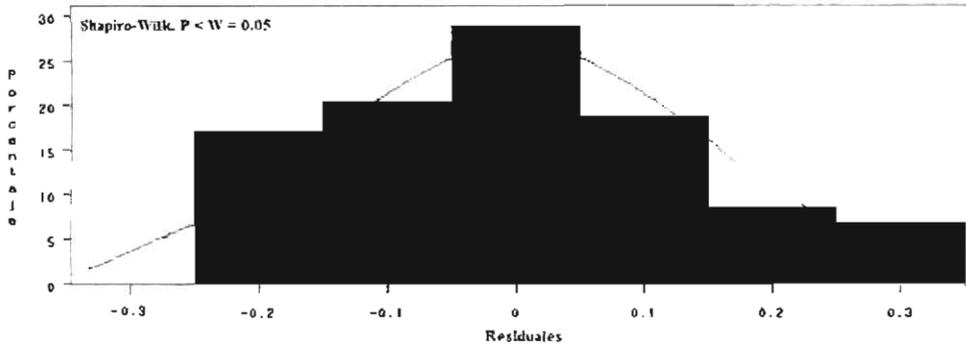


Figura 27. Normalidad de los residuales: modelo lineal ln del β -hidroxibutirato = relación grasa: proteína de leche

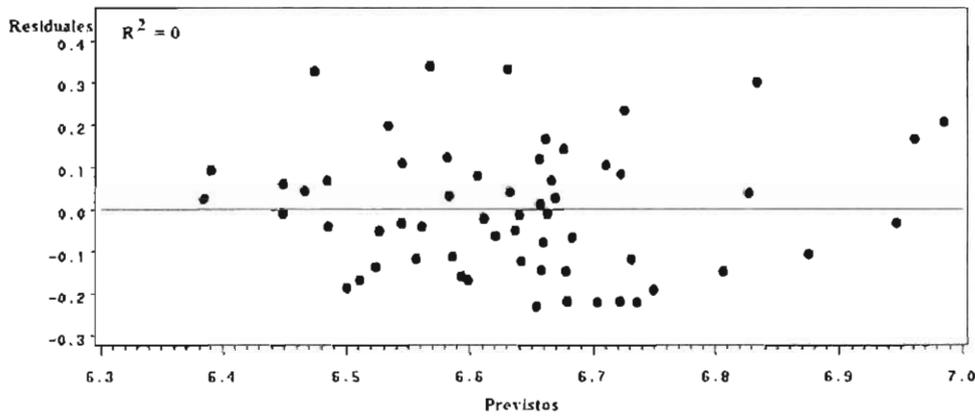


Figura 28. Homocedasticidad: modelo lineal residuales = previstos. Residuales (●); respuesta pronosticada (—)



La glándula mamaria utiliza nutrientes energéticos como la glucosa para sintetizar aminoácidos no esenciales y cubrir la síntesis de proteínas de la leche (Doepel y Lapiere, 2010). Sin embargo, durante la lactancia temprana los ácidos grasos no esterificados también utilizan nutrientes energéticos para realizar su oxidación mitocondrial (Sánchez, 2006) generando una competencia por glucosa con la glándula mamaria. Esto sugeriría una marcada reducción en la síntesis de proteínas de la leche en hatos con cetosis subclínica. Sin embargo, la variación explicada por el modelo sólo alcanzó el 42 % con la relación grasa: proteína de leche. Estos resultados sugieren que la glándula mamaria altera de manera diferente su captación de glucosa y aminoácidos en respuesta a la cantidad y el perfil de nutrientes presentado a la misma. Hipótesis apoyada por Doepel y Lapiere (2010) y Lemosquet *et al.* (2009), que establecieron que cuando la energía se limita, la glándula mamaria obtiene parte de su energía a partir de otros nutrientes diferentes a la captación de glucosa mamaria como acetato, β -hidroxibutirato y aminoácidos esenciales. Por lo tanto el modelo propuesto alcanza sólo el 42 % debido a que las variaciones observadas en la relación grasa: proteína de leche están vinculadas a los intercambios metabólicos entre varios nutrientes energéticos, tanto a nivel corporal como a nivel mamario por lo que estas variaciones no se explican únicamente por la disponibilidad de glucosa en la glándula mamaria.

Dado que la relación grasa: proteína de leche refleja el estado de equilibrio energético del hato (Čejna y Chládek, 2005; Lemosquet *et al.*, 2009; Butcher *et al.*, 2010) y que esta variable presenta una relación media y positiva con la concentración de β -hidroxibutirato sanguíneo, se generó el Cuadro 13 con los valores previstos calculados a partir del modelo de regresión, estableciendo que con 95 % de confianza tanto el valor de la variable dependiente como el de su previsto se encuentran dentro del rango establecido con un α de 0.95.

El modelo lineal propuesto podría ser una herramienta útil para los administradores de múltiples hatos. Los hatos con una marcada lipo-movilización, mostrada a través de una relación grasa: proteína de leche elevada durante la lactancia temprana, pueden ser marcados para una atención adicional y prevenir la presencia de cetosis subclínica y la pérdida de leche (Duffield *et al.*, 2009) o para hacer un diagnóstico anticipado de problemas posteriores al parto.

Cuadro 13. Valores previstos: modelo lineal β -hidroxibutirato = relación grasa: proteína

Hato	BHBA ⁽¹⁾	Previsto	95 % CL BHBA		95 % CL Previsto		Residual ⁽²⁾	Log Residual ⁽³⁾
1	923.53	922.61	888.91	1051.63	706.27	1326.10	0.90	-0.10
2	721.67	720.54	692.29	749.95	533.79	982.40	1.13	-0.12
3	846.36	845.56	804.32	888.91	620.17	1141.39	0.80	-0.22
4	652.93	651.97	614.00	699.24	482.99	888.91	0.96	-0.04
5	781.54	780.55	749.95	812.41	578.25	1064.22	0.99	0.01
6	646.52	645.48	601.85	685.40	473.43	880.07	1.04	0.04
7	750.89	749.95	720.54	780.55	555.57	1012.32	0.94	-0.06
8	714.77	713.37	678.58	742.48	523.22	962.95	1.40	0.34
9	686.35	685.40	645.48	720.54	502.70	925.19	0.95	-0.05
10	765.98	765.09	735.10	796.32	566.80	1043.15	0.89	-0.12
11	907.73	906.87	845.56	962.95	665.14	1224.15	0.86	-0.15
12	797.18	796.32	765.09	828.82	584.06	1074.92	0.86	-0.15
13	590.96	589.93	544.57	645.48	432.68	812.41	1.03	0.03
14	789.43	788.40	757.48	820.57	578.25	1064.22	1.03	0.03
15	781.42	780.55	749.95	812.41	572.49	1053.63	0.87	-0.14
16	789.47	788.40	757.48	820.57	578.25	1064.22	1.07	0.07
17	646.87	645.48	607.89	692.29	478.19	880.07	1.19	0.33
18	653.04	651.97	614.00	699.24	482.99	888.91	1.07	0.07
19	766.05	765.09	735.10	796.32	561.16	1032.77	0.95	-0.05
20	679.46	678.58	645.48	720.54	502.70	925.19	0.88	-0.13
21	838.42	837.15	796.32	871.31	614.00	1130.03	1.27	0.24
22	781.56	780.55	749.95	812.41	572.49	1053.63	1.01	0.01
23	721.57	720.54	692.29	757.48	533.79	982.40	1.03	0.03
24	797.47	796.32	757.48	828.82	584.06	1074.92	1.15	0.14
25	781.74	780.55	749.95	812.41	578.25	1064.22	1.19	0.17
26	1329.15	1327.92	1215.95	1464.97	1033.55	1748.18	1.23	0.21
27	693.26	692.29	665.14	727.78	512.86	943.88	0.97	-0.03
28	693.40	692.29	665.14	727.78	512.86	943.88	1.12	0.11
29	707.23	706.27	671.83	742.48	518.01	962.95	0.96	-0.04
30	728.68	727.78	692.29	757.48	533.79	982.40	0.90	-0.11
31	728.63	727.78	699.24	757.48	539.15	992.27	0.85	-0.16
32	926.23	925.19	862.64	992.27	678.58	1261.43	1.04	0.04
33	633.69	632.70	589.93	678.58	464.05	862.64	0.99	-0.01
34	672.67	671.83	639.06	713.37	492.75	915.99	0.84	-0.17
35	743.46	742.48	713.37	772.78	550.04	1012.32	0.98	-0.02
36	665.98	665.14	626.41	706.27	487.82	906.87	0.84	-0.18
37	1044.12	1043.15	934.49	1152.86	757.48	1422.26	0.97	-0.03
38	1054.82	1053.63	943.88	1176.15	765.09	1450.99	1.19	0.17
39	686.62	685.40	651.97	720.54	507.76	934.49	1.22	0.20
40	766.09	765.09	735.10	796.32	561.16	1032.77	0.99	0.01
41	758.87	757.48	727.78	788.40	561.16	1022.49	1.19	0.33
42	797.12	796.32	765.09	828.82	584.06	1074.92	0.80	-0.22
43	797.26	796.32	765.09	828.82	589.93	1085.72	0.94	-0.06
44	596.95	595.86	544.57	651.97	437.03	812.41	1.09	0.09
45	707.17	706.27	671.83	735.10	518.01	953.37	0.90	-0.11
46	829.62	828.82	788.40	871.31	614.00	1130.03	0.80	-0.22
47	813.21	812.41	780.55	854.06	601.85	1107.65	0.80	-0.22
48	821.69	820.57	780.55	862.64	601.85	1118.79	1.12	0.11
49	773.58	772.78	742.48	804.32	572.49	1053.63	0.79	-0.23
50	633.76	632.70	589.93	678.58	464.05	862.64	1.06	0.06
51	735.95	735.10	706.27	765.09	539.15	992.27	0.85	-0.16
52	781.68	780.55	749.95	812.41	572.49	1053.63	1.13	0.12
53	854.89	854.06	812.41	897.85	626.41	1164.45	0.83	-0.19
54	838.03	837.15	796.32	880.07	620.17	1141.39	0.89	-0.12
55	743.57	742.48	713.37	772.78	544.57	1002.25	1.08	0.08
56	758.52	757.48	727.78	788.40	561.16	1032.77	1.04	0.04
57	926.54	925.19	862.64	992.27	678.58	1261.43	1.35	0.30
58	829.90	828.82	788.40	871.31	614.00	1130.03	1.08	0.08
59	781.47	780.55	749.95	812.41	572.49	1053.63	0.92	-0.08

⁽¹⁾ β -hidroxibutirato μ M; ⁽²⁾ Diferencia entre los valores observados y los valores estimados; ⁽³⁾ Residual logarítmico

El Cuadro 14 muestra los estimadores de la regresión logística utilizada para examinar la asociación entre la ausencia y presencia de cetosis subclínica con respecto a la relación grasa: proteína de leche.

Cuadro 14. Estimador de máxima verosimilitud (β^T), *odds ratio* [$\text{Exp}(\beta^T)$], Max re-escalado R^2 (MRR2), sensibilidad, especificidad, falsos positivos (F^+) falsos negativos (F^-) de cetosis subclínica a través de su asociación con la relación grasa: proteína de leche en 10 diferentes puntos de corte de β -hidroxibutirato sanguíneo, $n = 59$ hatos

Punto de corte BHBA, mM	β^T	Exp (β^T)	MRR2	Sensibilidad Especificidad F^+ F^-			
				(%)			
0.91	24.55	4.61	0.38	45.5	95.8	28.6	11.5
0.92	25.71	1.46	0.40	33.3	98.0	25.0	10.9
0.93*	28.05	1.52	0.44	37.5	98.0	25.0	9.1
0.94	28.05	1.52	0.44	37.5	98.0	25.0	9.1
0.95	28.05	1.52	0.44	37.5	98.0	25.0	9.1
0.96	24.84	6.19	0.39	42.9	98.1	25.0	7.3
0.97	24.84	6.19	0.39	42.9	98.1	25.0	7.3
0.98	24.84	6.19	0.39	42.9	98.1	25.0	7.3
0.99	24.84	6.19	0.39	42.9	98.1	25.0	7.3
1	24.84	6.19	0.39	42.9	98.1	25.0	7.3

Los resultados indican que la relación grasa: proteína presentó asociación estadística con la cetosis subclínica. El estimador de máxima verosimilitud β^T para el punto de corte crítico fijado en 1 mM de β -hidroxibutirato sanguíneo fue de 24.84 ($P < 0.001$). Para la escala logarítmica de las probabilidades binominales (Logit), se establece que por cada aumento de una unidad en la relación grasa: proteína, el Logit aumentará en un 24.84. En lo referente al exceso o defecto de ventaja sobre la probabilidad (*odds ratio*, OR) se establece que por cada aumento de una unidad en la relación grasa: proteína se tiene 6.19 veces más ventaja sobre la probabilidad de presentar cetosis subclínica.

El modelo logístico propuesto demostró ser útil para estimar la presencia de cetosis subclínica a partir de la relación grasa: proteína de leche. Según los resultados del modelo, el mejor punto de corte para buscar la profilaxis y anticipar el diagnóstico de cetosis subclínica es de 0.93 mM de β -hidroxibutirato sanguíneo y se establece que por cada aumento de una unidad en la relación grasa: proteína se tiene 1.52 veces más ventaja sobre la probabilidad de padecer cetosis subclínica describiendo una forma sigmoidea en la respuesta pronosticada (Figura 29).

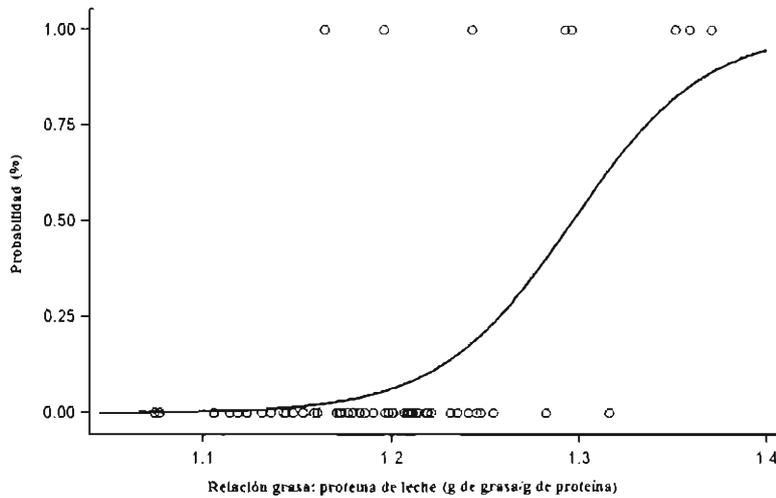


Figura 29. Predicción de la probabilidad de cetosis subclínica a través de su asociación con la relación grasa: proteína de leche. Intervalo de confianza del 95 %; punto de corte de 0.93 mM de β -hidroxibutirato sanguíneo; valores observados (\circ), respuesta pronosticada (—).

Las muestras de leche mostraron una media y desviación estándar de 1.19 ± 0.06 g de grasa/g de proteína (Cuadro 11) para la relación grasa: proteína de leche, con valores máximos de 1.37 y mínimos de 1.07 g de grasa/g de proteína. En este sentido Čejna y Chládek (2005) establecieron que la relación grasa: proteína en vacas Holstein Friesian se ubica en 1.17 gramos de grasa producida por 1 gramo de proteína. Por lo que los valores máximos registrados en el estudio, sugieren la presencia de cetosis subclínica en varios hatos. Čejna y Chládek (2005) y Mulligan *et al.* (2006b) confirmaron esta afirmación, indicando que valores cercanos o superiores a 1.4 indican una gran deficiencia energética y cetosis subclínica si los cuerpos cetónicos están



presentes y que un aumento en la relación grasa: proteína de leche en una proporción significativa de vacas durante lactancia temprana, señala un problema de transición que debería ser tratado a nivel de hato en el primer período seco y el período transitorio.

El Cuadro 15 muestra los porcentajes de sensibilidad y especificidad calculados a partir del modelo logístico que relaciona la ausencia y presencia de cetosis subclínica con respecto a la relación grasa: proteína de leche y los porcentajes de sensibilidad y especificidad de cinco pruebas comerciales para la detección de cetosis subclínica.

Cuadro 15. Sensibilidad y especificidad del modelo relación grasa: proteína y pruebas comerciales para detección de cetosis

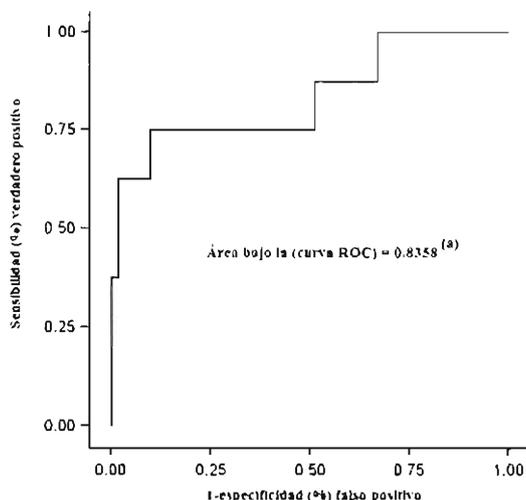
Prueba (distribuidor)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Modelo logístico (relación grasa: proteína de leche) ⁽¹⁾	42.9	98.1
Ketolac [®] tira reactiva (Hoechst, Unterschleissheim, Alemania) ⁽²⁾	3.4	100
Ketostix [®] tira reactiva (Bayer, Etobicoke, Ontario, Canadá) ⁽²⁾	4.6	100
Bioketone polvo (Biopharmaceutiques, Laval, Quebec, Canadá) ⁽²⁾	33.3	99.8
Ketocheck [™] polvo (Great States, St. Joseph, Missouri) ⁽²⁾	27.6	100
Utrecht polvo (Universidad de Utrecht, Utrecht, Países Bajos) ⁽²⁾	42.5	100

⁽¹⁾ datos de 59 muestras combinadas, una por cada hato (*pools* de 10 muestras individuales cada una) de leche y sangre, punto de corte 1 mM de β -hidroxibutirato sanguíneo. ⁽²⁾ datos de 529 muestras individuales (de 1 a 5 muestras por vaca) de leche y sangre, punto de corte 1 mM de β -hidroxibutirato sanguíneo para Ketolac y 1.2 mM de β -hidroxibutirato sanguíneo para Ketostix, Bioketone, Ketocheck y Utrecht. Fuente: (Geishauser *et al.*, 1998).

El punto de corte crítico fijado en 1 mM de β -hidroxibutirato sanguíneo para el modelo de regresión logística mostró valores de especificidad de 98.1 %, pero su sensibilidad fue menor de lo esperado (42.9 %). Los resultados indican que el modelo logístico fue más sensible para identificar verdaderos positivos con respecto a Ketolac, Ketostix, Bioketone, Ketocheck y Utrecht, siendo este último el más cercano al porcentaje de sensibilidad alcanzado por el modelo. Con respecto al porcentaje de especificidad el modelo logístico registró 98.1 % para identificar verdaderos negativos, un porcentaje ligeramente inferior en comparación con las cinco pruebas comerciales. Estos valores confirman que los hatos identificados con probable presencia de cetosis subclínica mediante el modelo logístico, deben ser monitoreados mediante pruebas

adicionales, mientras que los hatos con resultados de ausencia de cetosis subclínica pueden descartarse con un grado elevado de confianza.

El área bajo la característica operativa del receptor (curva ROC), fue de 0.83 (Figura 30), mediante esta representación de los pares (1-especificidad, sensibilidad) la curva ROC nos proporciona una representación global de la exactitud diagnóstica. Los resultados indican que existe un 83 % de probabilidad que el diagnóstico realizado a un hato con cetosis subclínica sea más aceptado que el de un hato sin cetosis subclínica escogido al azar.



(2) área bajo la curva ROC 0.5 a 0.6 prueba mala, 0.6 a 0.75: prueba regular, 0.75 a 0.9: prueba buena, 0.9 a 0.97: prueba muy buena, 0.97 a 1 prueba excelente

Figura 30. Curva ROC: modelo logístico ausencia y presencia de cetosis subclínica = relación grasa: proteína de leche. Respuesta pronosticada (—)

Al respecto Sorribas *et al.* (2002) establecen que si la prueba no permitiera discriminar entre grupos, la curva ROC sería una diagonal que une los vértices inferior izquierdo y superior derecho, por lo que al observar que la curva se localiza hacia el vértice superior izquierdo se confirma que la curva ROC obtenida, sí permite discriminar entre grupos.

Para cada variación que produzca cambios en la sensibilidad o especificidad, al menos un caso pasa a ser considerado como verdadero positivo, lo que corresponde a un trazo vertical, o

como falso positivo, lo que da lugar a un trazo horizontal. En el caso de que se produzcan empates, es decir, dos o más casos con el mismo valor de la prueba: si el empate ocurre entre un caso del grupo enfermo y otro del grupo sano aparecerá un trazo diagonal en la representación gráfica (Sorribas *et al.*, 2002). En este sentido la curva ROC obtenida por la asociación entre la ausencia y presencia de cetosis subclínica con respecto a la relación grasa: proteína de leche tiene la forma de una escalera confirmando casos verdaderos positivos y falsos positivos y la ausencia de casos con el mismo valor de la prueba entre el grupo enfermo y el grupo sano ya que no se observan trazos diagonales.

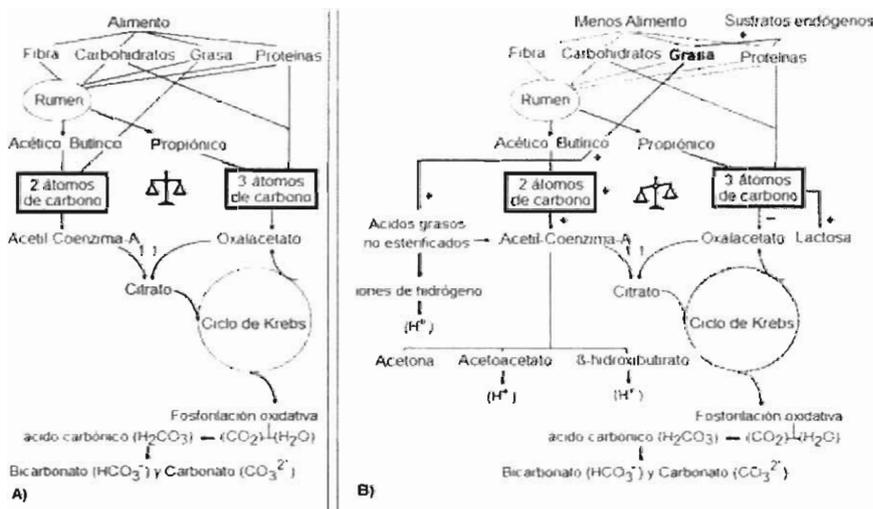
X. CONCLUSIÓN

El modelo lineal \ln del β -hidroxibutirato = relación grasa: proteína y el modelo logístico que relaciona la ausencia y presencia de cetosis subclínica con respecto a la relación grasa: proteína de leche, son herramientas útiles para el monitoreo de la concentración del β -hidroxibutirato y la detección de presencia de cetosis subclínica, especialmente porque la cuantificación de la relación grasa: proteína de leche se obtiene a partir de las pruebas de rutina para el análisis del rendimiento de leche en cada hato. Sin embargo, con base en el porcentaje de variación del \ln del β -hidroxibutirato explicado por el modelo lineal y el porcentaje de sensibilidad registrado en el modelo logarítmico, se sugiere sólo utilizar estas herramientas como un apoyo para el monitoreo del hato.

XI. PROSPECCIÓN

En la oxidación completa de los triacilgliceroles se genera una disolución en la que el disolvente es agua (H_2O) y el soluto principal es dióxido de carbono (CO_2), esta mezcla origina ácido carbónico (H_2CO_3) ácido débil que opera como un *buffer* al perder 1 ó 2 iones de hidrógeno (H^+) generando bicarbonato (HCO_3^-) y carbonato (CO_3^{2-}) respectivamente (Loerting y Bernard, 2010).

Si la oxidación de los triacilgliceroles es incompleta (como durante el balance energético negativo, característico de la lactancia temprana) se origina cetosis subclínica con la biosíntesis de ácidos no volátiles como el β -hidroxibutirato (Figura 31), sustancia que por su carácter ácido es capaz de liberar iones H^+ en el líquido extracelular, aumentando varias veces su concentración y reduciendo la capacidad *buffer* del bicarbonato por intercambio iónico y por lo tanto se incrementa la diferencia entre aniones y cationes en la sangre (Kraut y Madias, 2010). Por lo que sugerimos en futuras investigaciones que pretendan mejorar el modelo In del β -hidroxibutirato = relación grasa: proteína de leche considerar la aportación del estado ácido: base con la cuantificación de variables sanguíneas como Anión Gap y bicarbonato.



Fuente: Modificado a partir de (van Kneysel *et al.*, 2007a)

Figura 31. Alteración del estado ácido: base. ^{A)} Balance energético positivo; ^{B)} Balance energético negativo.

XII. APÉNDICE

Anexo I. Editor SAS para monitoreo de β -hidroxibutirato sanguíneo mediante regresión lineal

```

*-----*
* Titulo: Relacion entre el  $\beta$ -hidroxibutirato sanguíneo y la producción de grasa y proteína de leche *
* Autor: García Castillas Arturo César *
* Inocentre 2011 Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco *
* Descripción: Regresión lineal entre la variable respuesta continua  $\beta$ -hidroxibutirato sanguíneo y abocombitos *
* de variables explicativas continuas producción de proteína por hato, producción de grasa por hato y relación *
* grasa-proteína *
*-----*
TITLE "Relacion entre el  $\beta$ -hidroxibutirato sanguíneo y la producción de grasa y proteína de leche";
OPTIONS NODATE NOCENTER NONUMBER;
* Importar Macro de Microsoft Office *
PROC IMPORT OUT=WORK.Merge_profil_rtm_production
DATAFILE="C:\Users\César\Desktop\Merge_profil_rtm_production.xls"
DBMS=EXCEL2000 REPLACE,
SHEET=Data_Original,
GETNAMES=YES;
DATA Data_Maestria. SET work Merge_profil_rtm_production; RUN;
* Se relaciona el logaritmo natural del  $\beta$ -hidroxibutirato sanguíneo con la relación grasa-proteína *
* No los datos Outliers y negativos *
* Transmisión de todas las variables en formato Macro No DL (número de días en lactancia) *
* (PROD LECH_HATO) producción de leche por hato, (PROD GRAS_HATO) producción de grasa por hato *
* (PROD PROT_HATO) producción de proteína por hato y (RGP) relación grasa-proteína de leche *
* Media aritmética de los valores residuales y de todas las variables por hato contenidas en el Macro *
PROC REG. MODEL In_  $\beta$ HBA=RGP; output out=temp1 r=resid;
PROC ANOVA. CLASS Hato, MODEL resid=Hato,
PROC SORT out=temp1, by Hato;
%let var_prod=No_DL PROD_LECH_HATO PROD_GRAS_HATO PROD_PROT_HATO RGP;
PROC MEANS DATA=temp1;
VAR In_  $\beta$ HBA &var_prod; by Hato;
OUTPUT OUT=temp2 mean=mean_resid In_  $\beta$ HBA &var_prod; RUN;
* Importar Macro para diagnóstico Outlier (http://www.datavisualisation.com/Outlier_Version_1_2) *
* Autor: Friendly Michael *
* 01 agosto 2008, York University *
* Descripción: Calcula la distancia robusta de Mahalanobis para cada observación tomando en cuenta *
* las correlaciones entre las variables, la varianza de cada una. Asigna un peso a las observaciones con el *
* valor t de probabilidad de ser outliers. P, donde las observaciones con menor varianza tienen más importancia *
* que las de mayor varianza *
DATA temp3; SET temp2; abs_mean_resid=abs(mean_resid); i*abs=valores absolutos*;
* Probabilidad de ser clasificados como Outlier (weight = P) *
%outlier (Data=temp3, var=abs_mean_resid, id=Hato, out=temp4, pvalue=0.05, PASSES=5;
PROC SORT DATA=temp4 out=temp5; by Hato; RUN;
* Clasificación por "hatos Outliers" (confirmación visual por gráfico "hatos Outliers" estadística descriptiva de *
* los datos: Media aritmética, Desviación 1 standard, mínimo, máximo, normalidad, número de observaciones *
DATA hatos, merge temp2 temp5 (keep = hato_weight_); by Hato;
PROC GPI.OT DATA=hatos,
TITLE "Hatos Outliers",
axis1 order=6 to 8 by 0.25 minor=none,
axis2 order=1 to 1.4 by 0.1 minor=none;
symbol1 i=r1 v=dot c=black r=1, symbol2 i=r1 v=dot c=red,
plot In_  $\beta$ HBA*RGP= weight /vaxis=axis1 haxis=axis2,
PROC UNIVARIATE NORMAL plot DATA=hatos, WHERE _weight_=1;
VAR In_  $\beta$ HBA &var_prod; RUN;
```

```

* Regresión lineal Modelos sin hatos Outliers
* 1) logaritmo natural del B-hidroxi butirato sanguíneo = producción de grasa por hato
* 2) logaritmo natural del B-hidroxi butirato sanguíneo = producción de proteína por hato
* 3) logaritmo natural de B-hidroxi butirato = relación grasa/proteína
* DW = estadística Durbin-Watson para probar la ausencia de autocorrelación en los errores de regresión
* para el modelo de regresión, forma una matriz lineal con los datos y una columna de unos para el término de constante
* por hato) ln_BHBA*producción de proteína por hato) ln_BHBA*relación grasa/proteína) parachea
* Shapiro-Wilk e histograma normalidad de los residuos. Homoscedasticidad con normalidad visual por grafica
* "valores res. duales frente a valores previstos" resumen de estadísticas básicas y coeficientes de correlación
* de Pearson
/*1)*/
PROC REG DATA=hatos, WHERE _weight_ =1;
MODEL ln_BHBA=PROD_GRAS_HATO/DW CLM CLI;
OUTPUT OUT=regre1lineal r=residual predicted=previsto;
PROC GPLOT DATA=hatos, WHERE _weight_ =1,
TITLE "ln_BHBA*producción de grasa por hato",
axis1 order=6 to 8 by 0.25 minor=none,
axis2 order=0.85 to 1.53 by 0.16 minor=none,
symbol1 i=r1 v=dot c=black r=1;
plot ln_BHBA*PROD_GRAS_HATO= _weight_ /vaxis=axis1 haxis=axis2;
PROC UNIVARIATE NORMAL DATA=regre1lineal; VAR residual; HISTOGRAM/cfill=gray normal;
PROC REG DATA=regre1lineal; MODEL residual=previsto; RUN;
/*2)*/
PROC REG DATA=hatos, WHERE _weight_ =1,
MODEL ln_BHBA=PROD_PROT_HATO/DW CLM CLI;
OUTPUT OUT=regre2lineal r=residual predicted=previsto;
PROC GPLOT DATA=hatos; WHERE _weight_ =1,
TITLE "ln_BHBA*producción de proteína por hato";
axis1 order=6 to 8 by 0.25 minor=none,
axis2 order=0.76 to 1.24 by 0.22 minor=none;
symbol1 i=r1 v=dot c=black r=1;
plot ln_BHBA*PROD_PROT_HATO= _weight_ /vaxis=axis1 haxis=axis2;
PROC UNIVARIATE NORMAL DATA=regre2lineal; VAR residual; HISTOGRAM/cfill=gray normal;
PROC REG DATA=regre2lineal; MODEL residual=previsto; RUN;
/*3)*/
PROC REG DATA=hatos; WHERE _weight_ =1,
MODEL ln_BHBA=RGP/DW CLM CLI;
OUTPUT OUT=regre3lineal r=residual predicted=previsto;
PROC GPLOT DATA=hatos; WHERE _weight_ =1;
TITLE "ln_BHBA*relación grasa/proteína",
axis1 order=6 to 8 by 0.25 minor=none;
axis2 order=1 to 1.4 by 0.1 minor=none;
symbol1 i=r1 v=dot c=black r=1;
plot ln_BHBA*RGP= _weight_ /vaxis=axis1 haxis=axis2;
PROC UNIVARIATE NORMAL DATA=regre3lineal; VAR residual; HISTOGRAM/cfill=gray normal;
PROC REG DATA=regre3lineal; MODEL residual=previsto; RUN;
PROC CORR DATA=hatos, WHERE _weight_ =1, VAR PROD_GRAS_HATO PROD_PROT_HATO RGP;
WITH ln_BHBA; RUN;
* Imprimir DATA=hatos en Excel con weight_ =1, en el menú File>Export>Data to Excel, en el registro ln_BHBA
* logaritmo natural del B-hidroxi butirato y RGP (relación grasa/proteína). Salvar la base de datos en formato
* Microsoft Office Excel 2007 con el nombre Hatos sin Outliers (weight_ =1) xls para un análisis de regresión
* logística
PROC PRINT DATA=hatos, WHERE _weight_ =1, VAR Hato ln_BHBA RGP_weight_ ; RUN, QUIT;

```



XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Angulo, A. J., L. L. Mahecha y A. M. Olivera. 2009. Synthesis, composition and modification of the bovine milk fat: A valuable nutrient for the human health. *Rev MVZ Córdoba* 14(3):1856-1866.
2. Bauman, D. E., I. H. Mather, R. J. Wall y A. L. Lock. 2006. Major advances associated with the biosynthesis of milk. *J Dairy Sci* 89(4):1235-1243.
3. Bobe, G., J. W. Young y D. C. Beitz. 2004. Invited review: pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. *J Dairy Sci* 87(10):3105-3124.
4. Brickner, A. E., R. R. Rastani y R. R. Grummer. 2007. Technical note: Effect of sampling protocol on plasma nonesterified fatty acid concentration in dairy cows. *J Dairy Sci* 90(5):2219-2222.
5. Butchereit, N., E. Stamer, W. Junge y G. Thaller. 2010. Evaluation of five lactation curve models fitted for fat:protein ratio of milk and daily energy balance. *J Dairy Sci* 93(4):1702-1712.
6. Campos, R., F. González, L. Lacerda y A. Coldebella. 2005. Metabolic profile obtained in *pooled* serum or the individual samples. *Rev Arch Zootec* 54(205):113-116.
7. CANILEC. 2012. La producción nacional de leche y las perspectivas de crecimiento económico 2011 por la OCD. Cámara Nacional de Industriales de la Leche. [en línea]. http://www.canilec.org.mx/prod_leche.html. Consultado 1 Feb, 2012.
8. Carrier, J., S. Stewart, S. Godden, J. Fetrow y P. Rapnicki. 2004. Evaluation and use of three cow-side tests for detection of subclinical ketosis in early postpartum cows. *J Dairy Sci* 87(11):3725-3735.
9. Čejna, V. y G. Chládek. 2005. The importance of monitoring changes in milk fat to milk protein ratio in holstein cows during lactation. *J Cent Eur Agr* 6(4):539-546.



10. CNOG. 2009. Información económica pecuaria. Confederación Nacional de Organizaciones Ganaderas. Dirección de estudios económicos y comercio internacional. [en línea]. http://cnog.org.mx/index.php?option=com_jevents&task=cat.listevents&year=2010&month=10&day=05&Itemid=0. Consultado 6 Dic, 2010.
11. CODEX. 1999. Norma del CODEX para las leches en polvo y la nata (crema) en polvo. CODEX ALIMENTARIUS. [en línea]. www.codexalimentarius.net/download/.../CXS_207s.pdf. Consultado 6 Ene, 2011.
12. Correa, H. J. y J. Carulla. 2009. Relation between nutrition and health in dairy herds. *Rev Med Vet Zoot* 56(3):273-291.
13. Cuervo, V. W. A. 2009. Mecanismos de control de la gluconeogénesis en la vaca en transición. Tesis/trabajos de grado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Producción Animal. Medellín, Colombia.
14. Dann, H. M. y J. K. Drackley. 2005. Carnitine palmitoyltransferase I in liver of periparturient dairy cows: effects of prepartum intake, postpartum induction of ketosis, and periparturient disorders. *J Dairy Sci* 88(11):3851-3859.
15. Dann, H. M., D. E. Morin, G. A. Bollero, M. R. Murphy y J. K. Drackley. 2005. Prepartum intake, postpartum induction of ketosis, and periparturient disorders affect the metabolic status of dairy cows. *J Dairy Sci* 88(9):3249-3264.
16. Dann, H. M., N. B. Litherland, J. P. Underwood, M. Bionaz, A. D'Angelo, J. W. McFadden y J. K. Drackley. 2006. Diets during far-off and close-up dry periods affect periparturient metabolism and lactation in multiparous cows. *J Dairy Sci* 89(9):3563-3577.

17. Doepel, L. y H. Lapierre. 2010. Changes in production and mammary metabolism of dairy cows in response to essential and nonessential amino acid infusions. *J Dairy Sci* 93(7):3264-3274.
18. Douglas, G. N., T. R. Overton, H. G. Bateman, 2nd, H. M. Dann y J. K. Drackley. 2006. Prepartal plane of nutrition, regardless of dietary energy source, affects periparturient metabolism and dry matter intake in Holstein cows. *J Dairy Sci* 89(6):2141-2157.
19. Duffield, T. F. 2004. Monitoring strategies for metabolic disease in transition dairy cows. Department of Population, Ontario Veterinary College, University of Guelph, Ontario Canada. Proceedings of the 23rd World Buiatrics Congress, Quebec City, Canada.
20. Duffield, T. F., K. D. Lissemore, B. W. McBride y K. E. Leslie. 2009. Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *J Dairy Sci* 92(2):571-580.
21. FAO-GIEWS. 2010. Ganadería bovina en América latina: escenario 2008-2009 y tendencias del sector. Comisión de desarrollo ganadero para América latina y el Caribe (CODEGALAC). [en línea]. <http://www.rlc.fao.org/it/publications-et-documents/ganaderia-bovina-en-america-latina-escenario-2008-2009-y-tendencias-del-sector/>. Consultado 15 Ene, 2011.
22. FAO. 2012. Perspectivas alimentarias. Análisis del mercado mundial. Leche y productos lácteos. [en línea]. <http://www.fao.org/giews/spanish/fo/index.htm>. Consultado 20 Feb, 2012.
23. FIRA. 2011. Panorama Agroalimentario. Leche y Lácteos, 2011. Dirección de Análisis Económico y Sectorial. [en línea]. <http://portal.fira.gob.mx/Inf/splDtoXML/TemasUsuario.jsp>. Consultado 25 Ene, 2012.
24. FOSS. 2011. Productos: MilkoScan FT+. Aplicaciones, parámetros y especificaciones técnicas. [en línea].



<http://www.foss.es/Solutions/ProductsDirect/MilkoScanflplus/Technical%20specifications.aspx>. Consultado 22 May, 2011.

25. Friendly, M. 2008. Macro Outlier. SAS System for Statistical Graphics, First Edition by SAS Institute Inc., Cary, NC. [en línea]. <http://www.datavis.ca/sas/mac/outlier.html>. Consultado 1 Ene, 2012.
26. Friggens, N. C., P. Berg, P. Theilgaard, I. R. Korsgaard, K. L. Ingvarsen, P. Lovendahl y J. Jensen. 2007. Breed and parity effects on energy balance profiles through lactation: evidence of genetically driven body energy change. *J Dairy Sci* 90(11):5291-5305.
27. Galvis, D. R., D. Agudelo y A. Saffon. 2007. Body condition, lipoprotein profile and ovarian activity in Holstein cows in early lactation. *Rev Col Cienc Pec* 20(1):16-29.
28. Gantner, V., K. Potocnik y S. Jovanovac. 2009. Test-day records as a tool for subclinical ketosis detection. *Acta Vet-Beograd* 59(2-3):185-191.
29. García, C. A. C. y L. A. R. Montiel. 2011. El período de transición de la vaca lechera. *Rev Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente* 11(22):151-172.
30. Geishauser, T., K. Leslie, D. Kelton y T. Duffield. 1998. Evaluation of five cow-side tests for use with milk to detect subclinical ketosis in dairy cows. *J Dairy Sci* 81(2):438-443.
31. Goff, J. P. 2006. Major advances in our understanding of nutritional influences on bovine health. *J Dairy Sci* 89(4):1292-1301.
32. Goldhawk, C., N. Chapinal, D. M. Veira, D. M. Weary y M. A. von Keyserlingk. 2009. Prepartum feeding behavior is an early indicator of subclinical ketosis. *J Dairy Sci* 92(10):4971-4977.
33. González, M. E. F. y I. Koenekamp. 2006. Adaptaciones metabólicas hepáticas en el período periparto en vacas de alta producción de leche. Tesis/trabajos de grado. Pontificia

34. Gozho, G. N. y T. Mutsvangwa. 2008. Influence of carbohydrate source on ruminal fermentation characteristics, performance, and microbial protein synthesis in dairy cows. *J Dairy Sci* 91(7):2726-2735.
35. Guo, J., R. R. Peters y R. A. Kohn. 2007. Effect of a transition diet on production performance and metabolism in periparturient dairy cows. *J Dairy Sci* 90(11):5247-5258.
36. Hristov, A. N., J. K. Ropp, K. L. Grandeem, S. Abedi, R. P. Etter, A. Melgar y A. E. Foley. 2005. Effect of carbohydrate source on ammonia utilization in lactating dairy cows. *J Anim Sci* 83(2):408-421.
37. Huzzey, J. M., M. A. von Keyserlingk y D. M. Weary. 2005. Changes in feeding, drinking, and standing behavior of dairy cows during the transition period. *J Dairy Sci* 88(7):2454-2461.
38. Iwersen, M., U. Falkenberg, R. Voigtsberger, D. Forderung y W. Heuwieser. 2009. Evaluation of an electronic cowside test to detect subclinical ketosis in dairy cows. *J Dairy Sci* 92(6):2618-2624.
39. Krall, E. 2006. Interactions between body condition, feeding, milk production and reproduction. *Rev Veterinaria, (Montevideo)* 41(163-164):21-29.
40. Kraut, J. A. y N. E. Madias. 2010. Metabolic acidosis: pathophysiology, diagnosis and management. *Nat Rev Nephrol* 6(5):274-285.
41. LeBlanc, S. J., K. D. Lissemore, D. F. Kelton, T. F. Duffield y K. E. Leslie. 2006. Major advances in disease prevention in dairy cattle. *J Dairy Sci* 89(4):1267-1279.



42. LeBlanc, S. J. 2010. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *J Reprod Dev* 56 (Suppl):S29-35.
43. Lehninger, A. L., D. L. Nelson y M. M. Cox. 2009. *Lehninger: Principios de Bioquímica* (5ª Edición). Ediciones Omega, S. A. Barcelona, España.
44. Lemosquet, S., G. Raggio, G. E. Lobley, H. Rulquin, J. Guinard-Flament y H. Lapiere. 2009. Whole-body glucose metabolism and mammary energetic nutrient metabolism in lactating dairy cows receiving digestive infusions of casein and propionic acid. *J Dairy Sci* 92(12):6068-6082.
45. LICONSA. 2010. Resumen de informe de autoevaluación para el primer semestre del año ante el consejo de administración. [en línea]. http://www.liconsa.gob.mx/innovaportal/v/1400/1/mx/comunicacion_social.html. Consultado 25 Feb, 2011.
46. Loerting, T. y J. Bernard. 2010. Aqueous carbonic acid (H₂CO₃). *Chemphyschem* 11(11):2305-2309.
47. Martínez, M. A. L., H. M. Pérez, A. L. Pérez y C. G. Gómez. 2010. Lipid digestion in ruminants: a review. *Rev Interciencia* 35(4):240-246.
48. MILENIO. 2010. México: Quebraron 30 mil ganaderos en 2009. [en línea]. <http://www.milenio.com/node/362146>. Consultado 20 Feb, 2011.
49. Mulligan, F., L. O'Grady, D. Rice y M. Doherty. 2006a. Production diseases of the transition cow: body condition score and energy balance. *J Irish Veterinary* 59(9):505-510.
50. Mulligan, F. J., L. O'Grady, D. A. Rice y M. L. Doherty. 2006b. A herd health approach to dairy cow nutrition and production diseases of the transition cow. *Anim Reprod Sci* 96(3-4):331-353.

51. Mulligan, F. J. y M. L. Doherty. 2008. Production diseases of the transition cow. *Vet J* 176(1):3-9.
52. Navarro, S. V., L. A. Zabala, Z. S. Gómez y P. M. d. P. Portillo. 2009. Cholesterol metabolism: updated databases. *Rev Española de Obesidad* 7(6):360-384.
53. Nielsen, N. I., N. C. Friggens, M. G. Chagunda y K. L. Ingvarsen. 2005. Predicting risk of ketosis in dairy cows using in-line measurements of beta-hydroxybutyrate: a biological model. *J Dairy Sci* 88(7):2441-2453.
54. ONU-UNFPA. 2012. Estado de la población mundial 2011. Fondo de Población de las Naciones Unidas [en línea]. http://www.unfpa.org/webdav/site/global/shared/documents/publications/2011/SP-SWOP2011_Final.pdf. Consultado 25 Feb, 2012.
55. Ospina, P. A., D. V. Nydam, T. Stokol y T. R. Overton. 2010a. Evaluation of nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. *J Dairy Sci* 93(2):546-554.
56. Ospina, P. A., D. V. Nydam, T. Stokol y T. R. Overton. 2010b. 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* 93(4):1596-1603.
57. RANDOX. 2009. RANBUT β -hidroxibutirato. Manual para uso del Kit RANDOX, art. 1007. Método cinético enzimático NAD⁺ dependiente. [en línea]. <http://www.cromoion.com/files/D-3%20Hidroxibutirato.pdf>. Consultado 22 May, 2011.
58. Ríos, C., M. P. Marín, M. Catafau y F. Wittwer. 2006. Relationship between blood metabolites (β -hydroxybutyrate, NEFA, cholesterol and urea) and nutritional balance in three dairy goat herds under confinement. *Rev Arch Med Vet* 38(1):19-23.



59. Rutten, M. J., H. Bovenhuis, K. A. Hettinga, H. J. van Valenberg y J. A. van Arendonk. 2009. Predicting bovine milk fat composition using infrared spectroscopy based on milk samples collected in winter and summer. *J Dairy Sci* 92(12):6202-6209.
60. SAGARPA-SFA. 2012. Escenario Base del Sector Agropecuario en México, Proyecciones 2009 - 2018. Subsecretaría de Fomento a los Agronegocios y Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. [en línea]. <http://sagarpa.gob.mx/agronegocios/Estadisticas/Paginas/EscenarioBase2008-2018.aspx>. Consultado 1 Abr, 2012.
61. Sánchez, A., D. Sierra. C. Luengo, J. C. Corrales, C. T. Morales, A. Contreras y C. Gonzalo. 2005. Influence of storage and preservation on somatic cell count and composition of goat milk. *J Dairy Sci* 88(9):3095-3100.
62. Sánchez, S. B. 2006. Signaling pathways involved in the regulation of lipolysis in adipocytes. *REB* 25(3):80-84.
63. SAS. Institute Inc. 2001. SAS/STAT User's guide. Version 8.2. SAS Institute Inc.. Cary. NC.
64. Schiaffino, A., M. Rodríguez, M. I. Pasarin, E. Regidor, C. Borrell y E. Fernández. 2003. ¿Odds ratio or prevalence ratio? Their use in cross-sectional studies. *Gac Sanit* 17(1):70-74.
65. SIAP-SAGARPA. 2012. Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera. [en línea] http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=3&Itemid=29. Consultado 10 Feb, 2012.
66. Sorribas, A., J. March y J. Trujillano. 2002. A new parametric method based on S-distributions for computing receiver operating characteristic curves for continuous diagnostic tests. *Stat Med* 21(9):1213-1235.

67. van Knegsel, A. T., H. van den Brand, J. Dijkstra, W. M. van Straalen, M. J. Heetkamp, S. Tamminga y B. Kemp. 2007a. Dietary energy source in dairy cows in early lactation: energy partitioning and milk composition. *J Dairy Sci* 90(3):1467-1476.
68. van Knegsel, A. T., H. van den Brand, J. Dijkstra, W. M. van Straalen, R. Jorritsma, S. Tamminga y B. Kemp. 2007b. Effect of glucogenic vs. lipogenic diets on energy balance, blood metabolites, and reproduction in primiparous and multiparous dairy cows in early lactation. *J Dairy Sci* 90(7):3397-3409.
69. van Knegsel, A. T., S. G. van der Drift, M. Horneman, A. P. de Roos, B. Kemp y E. A. Graat. 2010. Short communication: ketone body concentration in milk determined by Fourier transform infrared spectroscopy: value for the detection of hyperketonemia in dairy cows. *J Dairy Sci* 93(7):3065-3069.
70. van Saun, R. J. 2006. Interpretation of *pooled* metabolic profiles for evaluating transition cow health status. Pages 3-015 Abstract #117 en Proc. XXIV World Buiatrics Congress. Nice, France.
71. Walsh, R. B., J. S. Walton, D. F. Kelton, S. J. LeBlanc, K. E. Leslie y T. F. Duffield. 2007. The effect of subclinical ketosis in early lactation on reproductive performance of postpartum dairy cows. *J Dairy Sci* 90(6):2788-2796.
72. Watters, R. D., J. N. Guenther, A. E. Brickner, R. R. Rastani, P. M. Crump, P. W. Clark y R. R. Grummer. 2008. Effects of dry period length on milk production and health of dairy cattle. *J Dairy Sci* 91(7):2595-2603.
73. Winkelman, L. A., T. H. Elsasser y C. K. Reynolds. 2008. Limit-feeding a high-energy diet to meet energy requirements in the dry period alters plasma metabolite concentrations but does not affect intake or milk production in early lactation. *J Dairy Sci* 91(3):1067-1079.

