

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE VETERINARIA DE LUGO
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLÍNICAS VETERINARIAS



***EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE SALES ANIÓNICAS EN
LA DIETA DEL BOVINO LECHERO COMO PREVENCIÓN DE LA
PARESIA PUERPERAL***

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO
DE DOCTOR EN VETERINARIA POR EL
LICENCIADO D. DIEGO HERBÓN MEILÁN.

LUGO, SEPTIEMBRE DE 2013



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias

Facultad de Veterinaria

Campus Universitario s/n.

27002 Lugo (ESPAÑA)

TELÉFONO 982255900-982285937

LUIS EUSEBIO FIDALGO ÁLVAREZ y **LUCIANO ESPINO LÓPEZ**, Profesores de la Unidad de Patología Médica y de la Nutrición, del Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela

INFORMAN:

Que el trabajo de investigación presentado por el Licenciado en Veterinaria D. Diego Herbón Meilán, titulado “Efecto de la administración de sales aniónicas en la dieta del bovino lechero como prevención de la paresia puerperal”, se ha realizado bajo nuestra dirección en la Unidad de Patología Médica y de la Nutrición del Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias de la Universidad de Santiago de Compostela, y consideramos que cumple todos los requisitos para optar al grado de Doctor.

En Lugo, Septiembre de 2013

Luis Eusebio Fidalgo Álvarez

Luciano Espino López

Agradecimientos

Para poder realizar esta memoria de tesis doctoral ha sido necesaria la colaboración de distintas personas, a las cuales quiero dedicarles unas breves y sinceras palabras de agradecimiento.

A mis directores, los profesores Luis Eusebio Fidalgo Álvarez y Luciano Espino López por confiar en mí, por vuestra dedicación, por orientarme y guiarme para que este proyecto sea una realidad.

A la profesora Ana Goicoa Valdevira por tus sabios consejos e infinita paciencia.

Al profesor Lucas Rigueira, a Paloma Carbajales, a todos los becarios y alumnos que han colaborado de manera desinteresada.

A los profesores del Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias, pues todos sin excepción han contribuido de una u otra forma a que esta memoria de doctorado sea una realidad.

Al profesor Luis Ramil por todas las tardes que dedicó a explicarnos la forma más conveniente y correcta de convertir los datos en resultados para interpretarlos correctamente y llegar a conclusiones ciertas.

A Javier García López, por permitirme continuar este proyecto tan apasionante, que él abandono para poder desarrollar plenamente su actividad profesional en estos tiempos difíciles.

A Natalia Miño y Noa Espino por haceros compartir alguna tarde aniónica.

A los socios de S.A.T. Vilamaior do Negral por vuestra absoluta disponibilidad y por facilitarnos tanto el trabajo.

A Pilar Barreiro por mostrarme y enseñarme la práctica clínica veterinaria del vacuno.

A Alberto Abad por tu compañerismo y amistad.

Para finalizar, una pequeña dedicatoria para aquellos que permanecen en la sombra pero son un pilar fundamental en mi vida, mis padres, mis hermanas, mi abuela, Alejandro, Manolo y especialmente tú, Ana.

A todos mi sincero agradecimiento.

Abreviaturas y Símbolos

Abreviaturas y Símbolos

ADN:	ácido desoxirribonucleico	l:	litro
AMP _c :	adenosín monofosfato cíclico	LH:	hormona luteinizante
ARN _m :	ácido ribonucleico mensajero	LT:	transformación logit de las ecuaciones de regresión logística para predecir la incidencia de hipocalcemia
A _{TOT} :	concentración plasmática total de tampones débiles no volátiles	M:	metritis
C:	cetosis	mcUI:	microunidad internacional
°C:	grados centígrados	mEq:	miliequivalentes
1,25(OH) ₂ D ₃ :	calcitriol	Mg ²⁺ :	magnesio
Ca :	calcio total	mg:	miligramos
Ca ²⁺ :	calcio iónico	MgSO ₄ :	sulfato de magnesio
CaBP:	calbindina o proteína ligadora de calcio	ml :	mililitros
CaCl ₂ :	cloruro cálcico	μU:	microunidades internacionales
CaR:	receptor del calcio	mmHg:	milímetros de mercurio
CaSO ₄ :	sulfato cálcico	mmol:	milimoles
Cl ⁻ :	cloro	MS:	materia seca
cm ³ :	centímetros cúbicos	N:	número
CO ₂ :	dióxido de carbono	Na ⁺ :	sodio
CPC:	cresolftaleína coplexona	NEFAS:	ácidos grasos libres no esterificados
d:	día	ng:	nanogramos
DA:	desplazamiento de abomaso	NH ₄ :	amoniac
DCAD:	diferencia catión-anión de la dieta	nm:	nanómetros
dl:	decilitro	NPY:	neuropéptido Y
EDTA-Na ₂ :	edetato disódico	NRC:	<i>Nacional Research Council</i>
FEDNA:	Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal	OH ⁻ :	grupo hidroxilo
FL:	fiebre de la leche	OPG:	osteoprotegerina
FSH:	hormona foliculoestimulante	P:	fósforo
g:	gravedad	pCO ₂ :	presión parcial de dióxido de carbono
GnRH:	hormona liberadora de gonadotropina	pg:	picogramos
gr:	gramos	pmol:	picomoles
H ⁺ :	ión hidrógeno	ppm:	partes por millón
HCl:	ácido clorhídrico	Pr-PTH:	péptido relacionado con la PTH
HCO ₃ ⁻ :	bicarbonato	PTH:	hormona paratiroidea
HPS:	hipocalcemia subclínica	PO ₄ ⁻³ :	ión fosfato
H ₂ SO ₄ :	ácido sulfúrico	® :	marca registrada
IGF ⁻¹ :	factor de crecimiento de la insulina tipo I	RANKL:	receptor activador del factor nuclear κB
K ⁺ :	potasio	RD:	Real Decreto
K _a :	constante de disociación plasmática de los ácidos débiles no volátiles	RIA:	radioinmunoensayo
kD:	kilodaltons	RP:	retención de placenta
kg:	kilogramo	rpm:	revoluciones por minuto
		RXR:	receptor retinoide
		S :	solubilidad del CO ₂ en el plasma

Abreviaturas y Símbolos

S⁻² : azufre.
SID⁺: diferencia de iones fuertes
Sig: significación
SO₄²⁻: ión sulfato
UI : unidades internacionales.

VDR: receptor de vitamina D
VDRES: elementos de respuesta a la
vitamina D

Índice

ÍNDICE

1. Introducción y Justificación del Tema.....	3
2. Objetivos.....	9
3. Revisión Bibliográfica.	13
3.1. Homeostasis Cálcica.	13
3.1.1. Introducción.	13
3.1.2. Funciones del Calcio.	14
3.1.3. Regulación de la Concentración Plasmática de Calcio.....	15
3.1.3.1. Hormonas Reguladoras.	16
3.1.3.1.1. Hormona Paratiroidea (PTH).	17
3.1.3.1.2. Calcitonina.	20
3.1.3.1.3. Vitamina D.	21
3.1.3.1.4. Otras Hormonas.	24
3.1.3.1.4.1. Péptido Relacionado con la PTH (PTH-rp).	24
3.1.3.1.4.2. Estrógenos.	25
3.1.3.1.4.3. Glucocorticoides.	25
3.2. Prevención de la Paresia Puerperal Hipocalcémica.....	28
3.2.1. Administración Exógena de Determinados Elementos que Participan en la Homeostasis Cálcica.....	28
3.2.1.1. Calcio Vía Oral.....	28
3.2.1.2. PTH.	34
3.2.1.3. Vitamina D y sus Metabolitos.	35
3.2.2. Estrategias Basadas en Mantener Activos los Mecanismos Endógenos Encargados de Regular la Homeostasis Cálcica.	39
3.2.2.1. Administración de Dietas Bajas en Calcio.....	39
3.2.2.2. Administración de Sales Aniónicas en el Parto.	41

Índice

3.2.2.2.1. Características de las Principales Sales Aniónicas.....	47
3.2.2.2.2. Bases Fisiológicas para la Utilización de las Sales Aniónicas.....	49
3.2.2.2.2.1. Factores que Interfieren en la Homeostasis Cálcica a Nivel Celular.....	49
3.2.2.2.2.1.1. Alcalosis Metabólica.....	49
3.2.2.2.2.1.2. Hipomagnesemia.....	51
3.2.2.2.2.1.3. Hiperfosfatemia.....	53
3.2.2.2.3. Cambios Producidos por las Sales Aniónicas en Sangre, Orina, Intestino, Riñón y Hueso.....	53
3.2.2.2.3.1. Cambios en Sangre.....	53
3.2.2.2.3.2. Cambios en Orina.....	55
3.2.2.2.3.3. Intestino.....	59
3.2.2.2.3.4. Riñón.....	60
3.2.2.2.3.5. Hueso.....	62
3.2.2.2.4. Sales Aniónicas y Minerales Séricos.....	65
3.2.2.2.4.1. Calcio, Fósforo y Magnesio.....	65
3.2.2.2.4.2. Sodio, Potasio y Cloro.....	68
3.2.2.2.5. Sales Aniónicas y Hormonas Calcitropicas.....	70
3.2.2.2.6. Tiempo de Administración de la Dieta Aniónica.....	72
3.2.2.2.7. Sales Aniónicas e Incidencia de la Paresia Puerperal y otras Patologías del Posparto.....	75
3.2.2.2.8. Limitaciones del Uso de Las Sales Aniónicas.....	78
3.2.2.2.8.1. Reducción de la Ingesta de Alimento.....	78
3.2.2.2.8.2. Producción y la Calidad de la Leche.....	81
3.3 Marcadores del Metabolismo Energético: Leptina e Insulina.....	83
3.3.1. Leptina.....	83
3.3.1.1 Fisiología de la Leptina.....	84
3.3.1.1.1 La Leptina y el Eje Hipotálamo-Hipofisario.....	84
3.3.1.1.2. Ingestión y Peso Corporal.....	85
3.3.1.1.3. Cambios durante la Preñez y durante la Lactación.....	85
3.3.1.1.4. Correlación de la Leptina con otras Hormonas y la Condición Corporal.....	88
3.3.2. Insulina.....	89

4. Material y Métodos.....	95
4.1. Material Vivo Experimental.....	95
4.2. Alimentación Experimental.....	95
4.3. Protocolo de Recogida de Muestras.....	97
4.3.1. Gasometría, Serología, Hematología, Medición de Hormonas y Recogida de Orina.....	99
4.4. Parámetros Medidos y Metodología Empleada.....	100
4.4.1. Parámetros para Valorar el Estado Ácido-Básico Sanguíneo.....	100
4.4.1.1 Parámetros Medidos (pH, pCO ₂).....	100
4.4.1.2. Parámetros Calculados (HCO ₃ ⁻).....	100
4.4.2. Parámetros Medidos y Metodología Empleada para Valorar el Estado Ácido-Básico en Orina.....	101
4.4.2.1. pH Urinario.....	101
4.4.3. Minerales e Iones Sanguíneos Estudiados.....	101
4.4.3.1. Sodio, Potasio y Calcio Iónico.....	101
4.4.3.2. Cloro, Calcio Total, Fósforo y Magnesio.....	101
4.4.4. Otros Parámetros Bioquímicos: Proteínas Totales, Albúmina, Urea y Creatinina.....	102
4.4.4.1. Proteínas Totales.....	102
4.4.4.2. Albúmina.....	102
4.4.4.3. Globulinas.....	103
4.4.5. Análisis de Hormonas (PTH, Leptina e Insulina).....	103
4.4.5.1. PTH.....	103
4.4.5.2. Leptina.....	103
4.4.5.3. Insulina.....	103
4.5. Análisis Estadístico de los Resultados.....	104
5. Resultados.....	107
5.1. Efectos de la Dieta en el Estado Ácido-Base.....	107
5.1.1. pH Sangre.....	110
5.1.2. HCO ₃ ⁻	112
5.1.3. pCO ₂	114

Índice

5.1.4. pH Orina (Peachímetro).	116
5.2. Efectos de la Dieta en los Minerales Séricos y la PTH.	121
5.2.1. Sodio, Potasio y Cloro.	121
5.2.1.1. Sodio (Na ⁺).	122
5.2.1.2. Potasio (K ⁺).	124
5.2.1.3. Cloro (Cl ⁻).	126
5.2.2. Calcio Total, Calcio Iónico, Fósforo, Magnesio y Paratohormona.	128
5.2.2.1. Calcio Total (Ca).	130
5.2.2.2. Calcio Iónico (Ca ⁺²).	132
5.2.2.3. Magnesio (Mg ⁺²).	134
5.2.2.4. Fósforo (P).	136
5.2.2.5. Paratohormona (PTH).	138
5.3. Efecto de la Dieta en otros Parámetros Séricos de Interés.	141
5.3.1. Proteínas Séricas.	142
5.3.2. Albúmina.	144
5.3.3. Globulinas.	146
5.3.4. Insulina.	148
5.3.5. Leptina.	150
6. Discusión.	155
6.1. Efecto de la DCAD en el Equilibrio Ácido-Base.	155
6.2. Efectos de la Dieta en los Minerales Séricos y la PTH.	162
6.2.1. Sodio, Potasio y Cloro.	162
6.2.2. Calcio Total, Calcio iónico, Fósforo y Magnesio y PTH.	165
6.3. Efecto de la Dieta en otros Parámetros Séricos de Interés: Proteínas Totales, Albúmina, Globulinas, Insulina y Leptina.	171
7. Conclusiones	179
Conclusión Final	179
8. Bibliografía	183

9. Resúmenes.....	231
9.1. Resumen.....	231
9.2 Summary.....	233

Introducción y Justificación

1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN DEL TEMA.

La paresia puerperal es una patología que se diagnóstico por primera vez en el ganado vacuno hace unos 215 años (Murray *et al.*, 2008). Tradicionalmente, la investigación se ha centrado en la presentación clínica y tratamiento de esta y otras patologías; sin embargo, es en estas últimas décadas cuando cobran relevancia la prevención de enfermedades de la producción y se han descubierto las distintas interacciones entre las patologías peripartales.

Tanto la presentación clínica como subclínica de la hipocalcemia están consideradas como la clásica “puerta de entrada” de la mayoría de las patologías del periodo peripartal (Mulligan y Doherty, 2008). Así, las vacas con paresia puerperal pueden tener una mayor incidencia de distocias, prolapsos uterinos, retenciones de placenta, endometritis, infertilidad, mamitis, desplazamiento de abomaso, cetosis e inmunosupresión (Houe *et al.*, 2001; Ducusin *et al.*, 2003) y un incremento de la concentraciones plasmáticas de los ácidos grasos libres no esterificados (NEFAS) (Reinhardt *et al.*, 2010).

La incidencia clínica de la paresia puerperal se encuentra, según un meta-análisis llevado a cabo sobre estudios de campo desde el año 1977 al 2009, entre un 3,45% en granjas norteamericanas, 3,50% en Australia y el 6,17% en Europa (DeGaris y Lean, 2008a). En nuestra zona de trabajo, los valores observados son similares a los que se describen en otros estudios europeos (Fidalgo *et al.*, 1994). Cuando estudiamos la incidencia de la forma subclínica, definida esta como una concentración del calcio plasmático menor de 8 mg/dl, el rango varía desde el 25% en las vacas de primer parto, el 41% en vacas de segunda lactación y hasta el 54% en vacas de quinta lactación (Reinhardt *et al.*, 2010).

El coste económico de un caso típico de fiebre de la leche está valorado en 334 dólares (Guard, 1996), teniendo en cuenta que un 8% de las vacas afectadas no se recuperan, el 12% de las vacas que se recuperan son eliminadas y el promedio de pérdida de leche de un animal que sufre hipocalcemia con respecto a otro sano es de unos 300-500 kg por lactación. También a parte de estos costes el impacto económico es muy elevado debido a que la vida media del animal se reduce en 3,4 años (Horst *et al.*, 1997). Así hace dos décadas, Ramos (1995) estimó que teniendo en cuenta los costes directos de tratamiento y los indirectos (disminución de la producción, reducción de la vida productiva de los animales

afectados, etc.), esta patología producía unas pérdidas de unos nueve millones de euros al año en Galicia.

De lo comentado con anterioridad, se justifica la necesidad de desarrollar una estrategia terapéutica destinada a disminuir la incidencia de las formas clínica y subclínica de la hipocalcemia. Con este motivo, a lo largo del tiempo se han empleado distintos medios y, de entre ellos, el manejo nutricional, debido a su fácil aplicación es el que ha obtenido los mejores resultados, especialmente, la manipulación de la diferencia anión-catión de la dieta mediante la adición de sales aniónicas. Esta medida preventiva ya se utilizó por primera vez hace 50 años (Ender *et al.*, 1962), pero todavía hoy en día no se conoce el mecanismo exacto de acción por el cual estas sales evitan la aparición de esta patología. A pesar del efecto beneficioso que provocan en las vacas de leche, no es hasta estos últimos años cuando se relanza la investigación sobre su aplicación profiláctica (Goff *et al.*, 2004; Charboneau *et al.*, 2006; Lean *et al.*, 2006; DeGaris y Lean, 2008a; Ramos-Nieves *et al.*, 2009; Gelfert *et al.*, 2010; Seifi *et al.*, 2010; Grünberg *et al.*, 2011).

De forma muy simplificada, el mecanismo de acción de las sales aniónicas se basa en que estas originan un estado de acidosis metabólica leve que aumenta la sensibilidad de diferentes tejidos a la acción de las hormonas calciotrópicas, lo que se traduce en un incremento de la absorción intestinal y movilización de calcio desde el hueso (Goff y Horst, 1997). Todo esto se traduce en una mejoría del metabolismo del calcio y reducción de la incidencia de la fiebre de la leche (Goff, 2008).

A día de hoy este método preventivo, dentro de los que modifican la composición de la dieta, es el más utilizado en las granjas comerciales (Martín-Tereso y Verstegen, 2011) pero aún así sólo lo emplean un 27% de las explotaciones norteamericanas (Grünberg *et al.*, 2011), aunque en granjas con más de 1000 animales se aplica entre un 60-70% (Goff y Horst, 2003a).

Uno de los principales inconvenientes que presentan estas sales es su mala palatabilidad (Goff y Horst, 2003a) por lo que siempre se recomienda un buen mezclado con los ingredientes de la dieta. Esto es especialmente complicado en rebaños pequeños y medios (<500 vacas) ya que no suele existir una ración especial para las vacas en transición, por lo que estas vacas reciben la misma dieta que las del posparto y las sales aniónicas deben de ser añadidas y mezcladas a mano para que no se produzca una disminución en la ingestión de materia seca (Gelfert *et al.*, 2009).

Esta desventaja en el empleo rutinario de las sales aniónicas durante el parto y los problemas que conlleva este proceso (Oetzel y Barmore, 1993; Goff y Horst, 2003a), es por lo que en la actualidad una de las líneas de investigación más importantes tiene como objetivo determinar cómo afectan estas a las distintas hormonas, factores de crecimiento y metabolitos en el posparto (Ramos-Nieves *et al.*, 2009; Degroot *et al.*, 2010; Seifi *et al.*, 2010; Wathes, 2012).

Dentro de las hormonas que desempeñan un papel importante en informar al eje reproductivo del status del balance energético de los animales destacan la insulina y leptina (Butler, 2003; Meikle *et al.*, 2004) aunque por el momento no hay datos sobre el efecto de las sales sobre el comportamiento de estas hormonas. En nuestro caso, al realizar el estudio en condiciones reales de una granja comercial en un sistema de producción semiextensivo y no poder medir de forma totalmente controlada la ingesta individualizada de los animales optamos por evaluar la concentración de insulina y leptina por el papel tan importante que desempeñan estas dos hormonas en informar al eje reproductivo del estatus del balance energético de los animales (Butler, 2003; Meikle *et al.*, 2004).

La mayoría de los estudios realizados proceden de granjas norteamericanas con un sistema de producción intensivo (Melendez *et al.*, 2003) y australianas en extensivo (Roche *et al.*, 2003), que son sistemas de producción diferentes de los de nuestra zona de trabajo; además muchos datos proceden de trabajos de investigación y no de aplicación directa en granja (Gelfert *et al.*, 2007; DeGroot *et al.*, 2010).

Por lo que en relación a todo lo anteriormente comentado, la principal motivación de esta tesis doctoral es comprobar los posibles beneficios y perjuicios de la inclusión en la dieta preparto de las sales aniónicas, en condiciones reales de una granja comercial representativa de nuestra área de trabajo, sin más modificaciones en la dieta y manejo de la explotación que la adición de estas sales.

Objetivos

2. OBJETIVOS

La presente memoria de tesis doctoral ha sido diseñada con el fin de estudiar, como objetivo general, el efecto de la administración de una dieta con sales aniónicas, en granjas lecheras comerciales con el sistema de producción de nuestra zona de trabajo. Para ello, este objetivo general lo hemos subdividido en los siguientes objetivos concretos:

1. Evaluar las variaciones en el equilibrio ácido-base y la respuesta del organismo asociadas a la ingesta de una dieta con sales aniónicas.
2. Establecer un método simple y de aplicación rutinaria en condiciones de campo, para monitorizar el efecto de dichas sales.
3. Comprobar la respuesta de los mecanismos implicados en la homeostasis mineral, con especial atención al calcio en las vacas que consumen la dieta adicionada con sales aniónicas.
4. Estimar el tiempo necesario de consumo de la dieta aniónica para producir efectos apreciables en la homeostasis ácido-base y cálcica.
5. Valorar de forma indirecta los cambios en el balance energético de los animales mediante el estudio de las variaciones en los niveles séricos de leptina e insulina asociados al consumo de dieta aniónica.

Revisión Bibliográfica

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

3.1. HOMEOSTASIS CÁLCICA.

3.1.1. INTRODUCCIÓN.

El calcio es uno de los siete macroelementos minerales que forman parte de los seres vivos, siendo el catión más abundante en el cuerpo de los mamíferos y constituye, aproximadamente, el 2% de su peso corporal (Payne, 1981). El 99% está depositado en los dientes y huesos y el 1% restante aparece en los tejidos blandos y líquido extracelular, donde su actividad es de gran importancia (Hunt y Blackwelder, 2001).

En el suero se distribuye en tres fracciones (figura 1):

- ❑ Calcio iónico: Constituye el 55 % del calcio sanguíneo. Está representado por los iones de calcio hidratados que están libres en el suero y es la parte que realmente tiene actividad biológica, ejerciendo las distintas funciones que se le atribuyen a este mineral (Rosol *et al.*, 2000).
- ❑ Calcio unido a complejos difusibles: Constituye el 10 % del total del calcio plasmático y no se conoce con exactitud su función (Toffaletti, 1983). Está ligado a moléculas de bajo peso molecular tales como bicarbonato, lactato, citrato y fosfato (Barler, 2001).
- ❑ Calcio unido a proteínas plasmáticas: Representa el 35 % del calcio sérico. Se une mayoritariamente con la albúmina y en menor cantidad a las globulinas. Actúa como una reserva para proporcionar calcio en las situaciones donde existe una reducción aguda de la parte iónica (Endres y Rude, 1994).

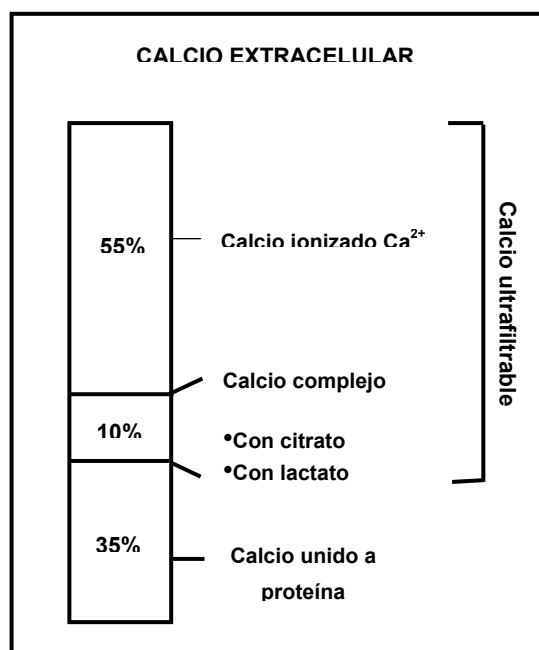


Figura 1: Esquema de la distribución del calcio en el líquido extracelular (Rosol *et al.*, 2000).

La distribución de calcio entre las diferentes fracciones está regida por la ley de acción de masas. Por lo tanto es dependiente de la concentración de este catión, de sus ligandos y del pH, ya que este último regula la tasa de unión del calcio a las proteínas. Así, al descender el pH sanguíneo se favorece la disociación del calcio de las proteínas, dado que los protones compiten con el calcio por los lugares de unión de las mismas, incrementando los niveles de calcio iónico; por el contrario en condiciones de alcalosis se estimula la ligazón de calcio a las proteínas y por ello se reduce el porcentaje de este mineral en forma iónica. Se estima que las oscilaciones de la concentración de calcio iónico se sitúan en 0,2 mg/dl por cada 0,1 unidades de variación del pH (Moore, 1970).

3.1.2. FUNCIONES DEL CALCIO.

En este apartado resumiremos brevemente algunas de las múltiples acciones biológicas que se atribuyen a este mineral:

- En primer lugar, junto con el fósforo, es uno de los componentes más abundantes de huesos y dientes. En los huesos aparece formando parte de los cristales de

hidroxiapatita y en los dientes principalmente como fluoruro cálcico (Guyton y Hall, 2006a).

- ❑ Se precisa de este ión para una correcta excitabilidad neuromuscular y transmisión del impulso nervioso. Al disminuir la concentración de calcio se produce un aumento de la excitabilidad de las fibras pre y posganglionares, apareciendo el efecto contrario cuando aumentan sus niveles (Guyton y Hall, 2006b).
- ❑ Participa en la contracción muscular, de forma que el calcio liberado desde el retículo sarcoplasmático induce la formación de puentes cruzados entre la actina y miosina, lo que se traduce en el acortamiento de la fibra muscular (Greco y Stabenfeldt, 1999).
- ❑ Se convierte en un elemento esencial en la coagulación sanguínea al permitir la transformación de protrombina en trombina (Guyton y Hall, 2006c).
- ❑ A nivel intracelular es necesario para la liberación de hormonas por exocitosis y la activación de diversas enzimas (Greco y Stabenfeldt, 1999).
- ❑ Este mineral parece ser imprescindible para la activación de los linfocitos T (Silva y Ruíz Moreno, 1998). Un descenso en los niveles de calcio extracelular puede disminuir hasta un 40 % la capacidad fagocítica de los macrófagos; además, la diapédesis y la fagocitosis de los neutrófilos también son dependientes de la concentración de este mineral (Young *et al.*, 1984; Tyzard, 1995).
- ❑ Otras funciones del calcio son el mantenimiento del tono de la musculatura lisa de los vasos sanguíneos, control del metabolismo de glucógeno en el hígado y regulación del crecimiento y división celular (Rosol *et al.*, 1995).
- ❑ Por último destacar que se considera al calcio como el principal mensajero iónico encargado de transmitir la información recibida en la superficie celular y enviarla al interior de la célula (Hurwitz, 1996).

3.1.3. REGULACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE CALCIO.

El calcio está implicado en multitud de funciones dentro del organismo, por lo que es de vital importancia para los vertebrados que su concentración extracelular se mantenga dentro de unos límites estrechos. Para ello han desarrollado mecanismos de regulación muy sensibles que les permiten mantener niveles plasmáticos de calcio adecuados en un ambiente que es

deficitario en este mineral (Schoenmakers *et al.*, 1999). Este sistema de control es tan eficaz que a diario se produce un intercambio de calcio entre 35-100 veces mayor que su concentración sérica y sin embargo, la calcemia se mantiene dentro del rango fisiológico (Ramberg *et al.*, 1975).

El calcio iónico extracelular es la fracción del calcio sanguíneo que va a ser activamente regulada (Brown, 1991), y en los mamíferos este control es llevado a cabo por las glándulas paratiroides (Collip, 1925, citado por Murray *et al.*, 2008).

Para controlar la calcemia es necesario que exista un sistema capaz de percibir las variaciones en la concentración de este mineral. Desde la segunda mitad de siglo veinte se trabajó con la hipótesis de que tendría que haber un receptor en la superficie de algunas células que informase de las oscilaciones en los niveles de calcio iónico (Nemeth *et al.*, 1987). Este receptor (CaR) se ha identificado y clonado en las células de las glándulas paratiroides en ganado bovino (Brown *et al.*, 1993). Por técnicas de biología molecular, se ha puesto de manifiesto su presencia en células del riñón, cerebro y de forma más reciente en las células C del tiroides (Garret *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 2001). Idénticos receptores están presentes en los osteoblastos (Dvorak *et al.*, 2004), en las células epiteliales del duodeno y del colon (Brown *et al.*, 2001) y, además durante la lactación, también se encuentra en el epitelio de la glándula mamaria (Cheng *et al.*, 1998).

3.1.3.1. HORMONAS REGULADORAS.

La homeostasis cálcica se mantiene por la acción conjunta de tres hormonas, que podemos dividir en dos grandes grupos en función de su naturaleza orgánica (Hurwitz, 1996):

- Hormonas peptídicas: en este grupo se encuadran la hormona paratiroidea (PTH) y calcitonina. Ambas responden a cambios en la concentración de calcio en pocos minutos. Tienen una vida media corta, lo que inicialmente nos podría hacer pensar que su acción es transitoria y destinada al control de desórdenes agudos; sin embargo, van a tener una acción a largo plazo ya que controlan la producción y actividad de otras hormonas con una respuesta más lenta.
- Hormonas esteroideas: en este grupo se incluye al calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$). Su actividad fisiológica se manifiesta después de varias horas y tiene una vida media más prolongada (horas) (Hurwitz *et al.*, 1983).

Otras hormonas, también de naturaleza peptídica o esteroidea, como los glucocorticoides, estrógenos, tiroxina, hormona del crecimiento, glucagón y prolactina, van a participar en la homeostasis cálcica en diferentes estados fisiológicos, tales como el crecimiento y lactación, y en algunas situaciones patológicas (Rosol *et al.*, 2000).

3.1.3.1.1. HORMONA PARATIROIDEA (PTH).

La hormona paratiroidea (PTH) se sintetiza en las células principales de las glándulas paratiroides y su vida media en suero es corta, aproximadamente 10 minutos, por lo que tiene que existir una secreción constante para que se mantengan unos niveles basales estables en el plasma (Schneider *et al.*, 1980).

Las glándulas paratiroides detectan los cambios en los niveles del calcio iónico en el plasma a través de los CaR (Chattopadhyay *et al.*, 1996). Estos receptores juegan un papel vital en la síntesis y en la liberación de PTH. Así, como se puede ver en la figura 2, bajas concentraciones de calcio iónico incrementan la secreción de PTH. Al aumentar la liberación, esta hormona lleva a cabo sus acciones contribuyendo a aumentar la concentración sanguínea de calcio. En contraposición, al aumentar la concentración de calcio iónico, los CaR inhiben la formación y secreción de PTH. Así, Hodnett *et al.* (1992a) demostraron que la cantidad de PTH circulante y la concentración sérica de calcio tenían una correlación proporcional inversa.

Los CaR no son sólo sensibles a la concentración de calcio iónico, sino que también se ven afectados por la concentración de magnesio, aunque con una baja afinidad, y también les influyen otras policiones incluyendo la poliamina espermita, la cual participa en el metabolismo celular de todas las células eucarióticas. Este receptor está igualmente influenciado, alostéricamente, por aminoácidos aromáticos (Brown y MacLeod., 2001). Hay evidencias de que los CaR limitan la resorción de calcio en los túbulos ascendentes de la corteza del riñón porque inhiben la reabsorción de magnesio, (Ward y Riccardi, 2002) lo que implica que el control renal de estos cationes divalentes está ligado.

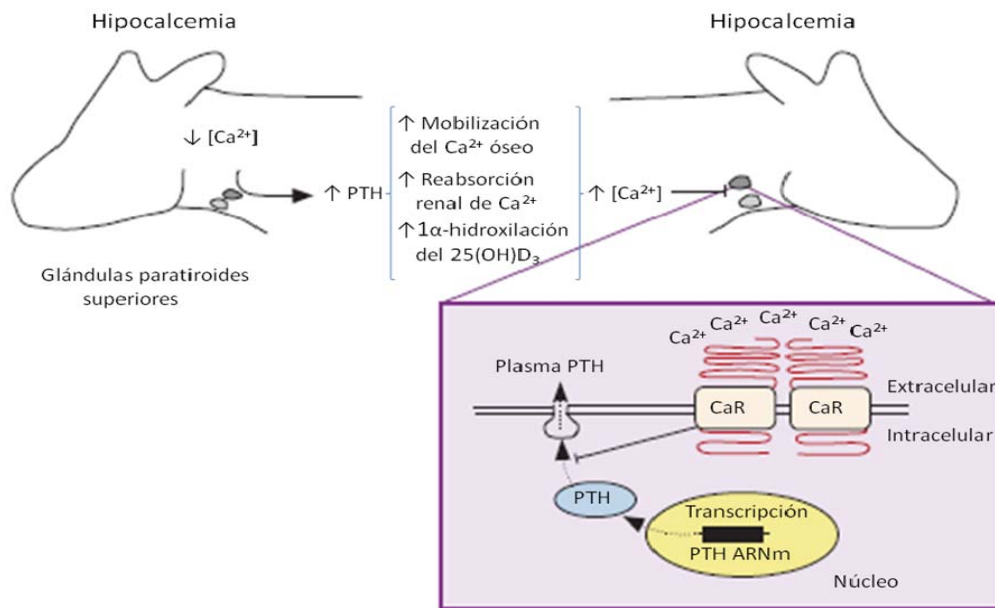


Figura 2: Control de la secreción de la PTH. (Modificado de Murray *et al.*, 2008).

Los niveles sanguíneos de calcitriol también afectan a la secreción de PTH y las concentraciones de ambas hormonas varían de forma inversa. Sin embargo, una porción importante de los efectos que se le atribuyen al calcitriol pueden ser secundarios a la influencia de esta hormona en los niveles sanguíneos de calcio, ya que el calcitriol incrementa la calcemia y esta elevación reduce la liberación de PTH (Hurwitz, 1996).

Aunque tradicionalmente se ha sugerido que el fósforo participa de forma indirecta en el control de la secreción de PTH, debido a su papel en la regulación de la concentración de calcio y síntesis de calcitriol (Sela *et al.*, 1997), estudios más recientes han detectado un efecto directo de la fosfatemia en la secreción de PTH (Estepa *et al.*, 1999).

Por último, diferentes sustancias, entre ellas catecolaminas, dopamina, isoproterenol, secretina y prostaglandina E₂ pueden estimular levemente la secreción de esta hormona (Habener *et al.*, 1984). Dado que la PTH responde rápidamente, y en sentido contrario a los cambios en la concentración plasmática de calcio (Hurwitz, 1996), su papel en la homeostasis de este mineral es de gran importancia.

Para poder mantener una concentración apropiada de calcio extracelular en la sangre y en el fluido intersticial debe existir un equilibrio entre la absorción de calcio en la dieta, los

depósitos de este mineral en el hueso y su excreción renal. Estos procesos están regulados por la PTH y el calcitriol, el cual está controlado en última instancia por las glándulas paratiroides (figura 3).

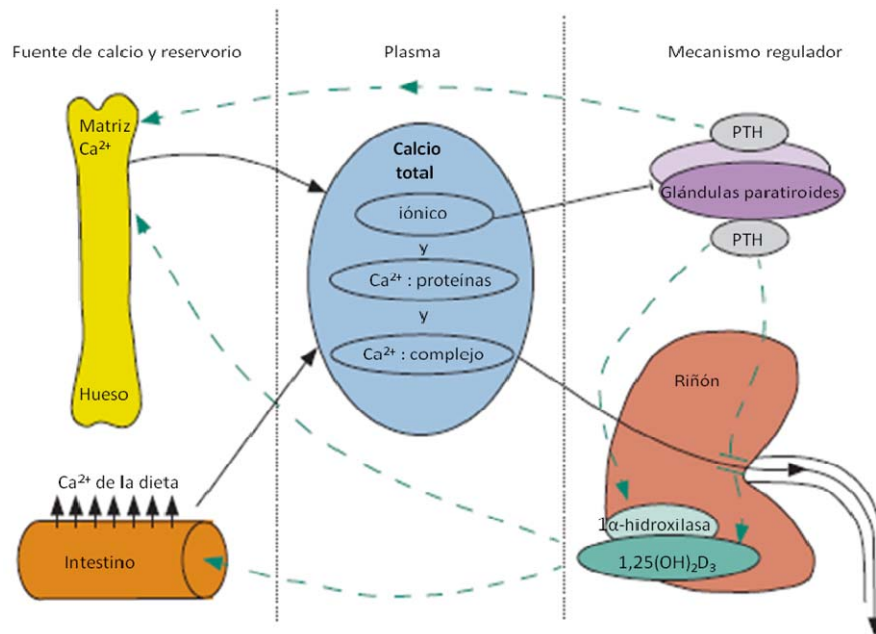


Figura 3: Control endocrino de la homeostasis cálcica. (Modificado de Murray *et al.*, 2008).

Los tejidos diana de la PTH, como podemos observar en la figura 3, son el hueso y riñón e indirectamente el intestino. De modo resumido las principales acciones de esta hormona son las siguientes.

- En el **hueso**, la PTH puede actuar como agente anabólico, estimulando la producción de hueso al intensificar la actividad de los osteoblastos. La importancia fisiológica de esta acción de la PTH “in vivo” es incierta, pero se ha observado que la administración intermitente de esta hormona incrementaba la masa ósea en humanos y animales (Canalis *et al.*, 1994). Por último, a nivel óseo, la PTH también favorece la movilización de calcio hacia el torrente circulatorio generando un incremento en la calcemia, como consecuencia de la activación de la reabsorción ósea mediada por los osteoclastos (Canalis *et al.*, 1994). Así según Murray *et al.*, (2008) hay distintos factores que pueden inhibir este proceso:

- Los estrógenos, producidos por la estereidogénesis placentaria durante el período inmediatamente antes del parto.
 - La calcitonina, liberada por las células C del tiroides en respuesta a la hipercalcemia.
 - La edad, porque las vacas viejas tienen menos osteoclastos capaces de responder a la PTH.
- En el **riñón**, la PTH es el principal elemento estimulador de la reabsorción tubular de calcio. Este efecto lo ejerce actuando sobre los canales de calcio en el túbulo contorneado distal (Yanagawa y Lee, 1992). También puede favorecer la reabsorción de este mineral a nivel de la rama ascendente del asa de Henle al incrementar la carga neta positiva en el lumen del nefrón, favoreciendo así la salida de calcio hacia el intersticio renal. Además, la PTH incrementa la actividad de la 1- α hidroxilasa renal, por lo que facilita la transformación del 25-hidroxicalciferol (calcidiol) en el metabolito activo, el calcitriol (Rosol y Capen, 1997). Por último, esta hormona también va a aumentar la excreción urinaria de fósforo (Goff *et al.*, 1986).
- **A nivel gastrointestinal**, la PTH incrementa la absorción de calcio indirectamente al aumentar la producción de calcitriol ($1,25 \text{ (OH)}_2\text{D}_3$) ya que esta hormona es la encargada de estimular la absorción activa de este mineral en el tracto digestivo (Abu-Damir *et al.*, 1994).

3.1.3.1.2. CALCITONINA.

La calcitonina se sintetiza en las células C o parafoliculares localizadas en la glándula tiroides. En condiciones de normocalcemia, la secreción de calcitonina es continua. La vida media de la hormona circulante en sangre es muy corta, estimada entre 2 y 15 minutos, siendo posteriormente metabolizada en el hígado y excretada por riñón (Rosol *et al.*, 2000).

La concentración de calcio iónico es el principal mecanismo de control de la liberación de esta hormona, de manera que la cantidad de calcitonina secretada es proporcional a la concentración de calcio iónico en el plasma (Care y Bates, 1972). El glucagón y diferentes hormonas digestivas, entre ellas gastrina y pancreocinina, incentivan su salida desde las células C hacia la sangre (Capen y Martin, 1983). El calcitriol y otros factores, por ahora no bien definidos, van a inhibir la síntesis de calcitonina (Azria, 1989).

La importancia de la calcitonina en la homeostasis cálcica no está todavía bien establecida y, así, algunos autores, como Munson y Hirsch (1992), concluyeron que esta hormona podría proteger frente a la hipercalcemia en situaciones extremas, pero en condiciones normales su actividad no sería necesaria. Su función principal en los vertebrados, debido a que viven en un medio ambiente pobre en calcio, es la de regular estados fisiológicos en los que pudiese existir una hipercalcemia (período posterior a una ingesta rica en calcio), o evitar deterioros esqueléticos ante requerimientos a largo plazo de altas cantidades de calcio (lactación y gestación) (Endres y Rude, 1994).

Los órganos diana de esta hormona son el hueso, riñón e intestino y su acción se manifiesta del siguiente modo:

- ❑ En el **hueso**, la calcitonina es un potente inhibidor de la reabsorción ósea por parte de los osteoclastos en los mamíferos (Azria, 1989). Estimula directamente la formación ósea al aumentar la proliferación y actividad de los osteoblastos, los cuales poseen receptores específicos para esta hormona (Farley *et al.*, 1991).
- ❑ En el **intestino**, esta hormona provoca la reducción en la absorción de calcio en el tracto digestivo. Esta tarea la lleva a cabo por dos mecanismos básicos: disminución de la permeabilidad de los enterocitos al calcio y ralentización del tránsito e ingesta de alimento (Biedefor *et al.*, 1974).
- ❑ En el **riñón**, la calcitonina afecta a la reabsorción tubular renal de calcio y también estimula la fosfaturia (Goff *et al.*, 1986).

3.1.3.1.3. VITAMINA D.

En los rumiantes, las principales fuentes de vitamina D son dos:

- ❑ La conversión en la piel del 7-dehidrocolesterol a colecalciferol (vitamina D₃) en presencia de la luz ultravioleta (288 nm) y una reacción térmica (Holick, 1997).
- ❑ Procedente de las plantas en forma de vitamina D₂. Esta se origina a partir de la conversión fotoquímica del ergosterol a vitamina D₂ (Horst y Reinhardt, 1997).

La vitamina D₃ sintetizada en la piel pasa al fluido extracelular y es transportada unida a la α_2 -globulina al hígado y otros tejidos, donde estará disponible para su activación (Cooke y Haddad, 1997). En los rumiantes, las vitaminas D₂ y D₃ procedentes de la dieta se

metabolizan en el rumen por los microorganismos, produciéndose al menos cuatro metabolitos diferentes.

En el hígado, el colecalciferol sufre primero una hidroxilación en el carbono 25 mediada por la enzima 25- α -hidroxilasa y da lugar al calcidiol (25(OH)D₃, el cual se acumula en el hígado, tejido adiposo y músculo hasta su posterior transformación (Hurwitz, 1996).

Una vez formado, el calcidiol puede ser convertido al menos a cuatro metabolitos diferentes; de todos ellos, la molécula que tiene mayor actividad biológica es el calcitriol. La transformación de calcidiol en calcitriol tiene lugar en las células epiteliales de los túbulos contorneados proximales del riñón, donde se localiza la enzima 1- α -hidroxilasa. Este paso está mediado por la PTH (Sansom *et al*, 1976) y es probable que la PTH en rumiantes sólo tenga efecto estimulador sobre la 1- α -hidroxilasa en condiciones de hipocalcemia, pero que no tenga ningún efecto durante un estado de normo o hipercalcemia (Horst y Reindhart, 1983).

De los restantes metabolitos producidos a partir del calcidiol el más importante, cuantitativamente, es el 24,25(OH)₂D₃. Aunque su función no está bien definida, se ha comprobado que aumenta la incidencia de paresia puerperal observándose niveles más altos de este metabolito en vacas que presentaban esta patología (Barton *et al*, 1984). También se ha demostrado que intensifica la absorción intestinal de calcio, pero su afinidad por los receptores y su potencia son menores que los del calcitriol (Proscal *et al.*, 1985).

La transformación de calcidiol en calcitriol es el paso limitante en la aparición de la hormona activa y su regulación es compleja y estricta. Las concentraciones plasmáticas de PTH, calcio, fosfato y calcitriol son los principales elementos moduladores de la actividad de la 1- α -hidroxilasa renal (Henry, 1997). Así, en vacas con hipocalcemia clínica se produce un retraso en la síntesis de esta hormona debido a las siguientes causas:

- Dietas con altos contenidos en cationes, que reducen la sensibilidad del tejido renal a la PTH (Goff, 2008).
- Altas concentraciones de fósforo, que inhiben la actividad de la enzima 1- α -hidroxilasa (Nagode y Chew, 1992).
- Los excesos o deficiencias de vitamina D (DeLuca *et al.*, 1990).

Otros factores que afectan adversamente a la absorción de calcio desde el intestino, son la disminución de la cantidad de receptores de esta hormona con la edad (Goff, 2000) y

también la raza, ya que las vacas Jerseys disponen de un menor número que las Holsteins. Diversas hormonas como la prolactina, estrógenos, hormona del crecimiento e IGF-I influyen de forma positiva en las concentraciones séricas de calcitriol, aunque su papel es de menos importancia (Hurwitz, 1996).

La vida media del calcitriol en suero se estima entre tres y seis horas, metabolizándose principalmente en el intestino y riñón. Los diferentes metabolitos inactivos de la vitamina D se excretan, mayoritariamente, en la bilis hacia las heces y menos del 4% se eliminan por la orina (DeLuca *et al.*, 1990).

Las principales acciones del calcitriol en la homeostasis cálcica son el control de la absorción intestinal de calcio y la modulación de la formación y reabsorción ósea. Además, existen evidencias de que también participa en la reabsorción tubular renal de calcio (Hurwitz, 1996). Así, podemos ver estas acciones en los siguientes puntos.

- ❑ **Absorción intestinal de calcio:** el calcitriol incrementa la captación activa de calcio y fósforo a través de los enterocitos al aumentar la permeabilidad del borde en cepillo de estas células (Wasserman, 1997); además, induce la síntesis de la calbindina (CaBP) o proteína ligadora de calcio, que se encarga del transporte de calcio a través del citoplasma de los enterocitos desde la superficie luminal hasta la membrana basolateral (Thomasset, 1997).
- ❑ **Remodelación ósea:** el calcitriol participa en la formación y reabsorción ósea, siendo su acción dependiente de la duración de la exposición del tejido óseo a niveles elevados de esta hormona. Estimula la diferenciación de osteoblastos a partir de las células progenitoras y acrecienta la actividad de los osteoblastos existentes en el hueso (Schoenmakers *et al.*, 1999). El calcitriol también colabora de forma activa en la reabsorción del hueso ya que promueve la diferenciación de precursores de monocitos en la médula ósea hacia osteoclastos (Suda y Takashashi, 1997).
- ❑ **Reabsorción renal:** el calcitriol promueve la reabsorción de calcio al inducir la síntesis de una proteína ligadora de calcio en las células tubulares (Iida *et al.*, 1993). La mayoría de las evidencias sugieren que el $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ afecta al transporte renal de calcio interaccionando con la PTH (Friedman y Gesek, 1993). Además, facilita la reabsorción de fósforo desde el filtrado glomerular e inhibe la actividad de la 1- α -hidroxilasa, evitando la producción excesiva de la forma activa de la vitamina D (Kumar, 1997).

3.1.3.1.4. OTRAS HORMONAS.

A continuación, citaremos algunas de las hormonas que participan en menor medida en el mantenimiento de la homeostasis cálcica.

3.1.3.1.4.1. PÉPTIDO RELACIONADO CON LA PTH (PTH-RP).

El PTH-rp no es una de las hormonas esenciales en la regulación de la homeostasis cálcica, pero se le atribuyen diferentes funciones en relación con el metabolismo de este mineral. Así, en el feto actúa como una hormona y su actividad es vital para mantener las concentraciones de calcio dentro de los rangos de referencia (Macisaac *et al.*, 1991). En el adulto, en condiciones normales, ejerce su acción como un factor paracrino en diferentes tejidos, principalmente en la glándula mamaria.

Se han encontrado tasas elevadas de esta hormona en la leche de diferentes especies, y se propuso que su papel sería estimular la eliminación de calcio, fósforo y magnesio a través de la misma (Law *et al.*, 1991). Tras su descubrimiento, se creyó que podría participar en la aparición de la paresia puerperal hipocalcémica; sin embargo, los datos de Kocalagli *et al.* (1995) parecen descartar que sea uno de los agentes causales de esta enfermedad. Estos investigadores comprobaron que no existía una correlación entre la concentración de calcio iónico en suero y los niveles de PTH-rp en leche y en consecuencia, demostraron que el PTH-rp, aunque puede tener alguna acción en el control del calcio sanguíneo, no es un factor determinante en la regulación endocrina de este mineral.

Los últimos estudios sobre el PTH-rp demuestran que el CaR se expresa durante la lactación en el epitelio de la glándula mamaria de las mujeres (Cheng *et al.*, 1998) y también puede regular la producción del PTH-rp en cultivos de células de cáncer de mama (Sanders *et al.*, 2000). En un estudio realizado en roedores en lactación (Van Houten *et al.*, 2004), los autores proponen que la función del CaR, del epitelio mamario, sería controlar la producción del PTH-rp. Este a su vez, sería el encargado de regular la secreción de calcio y la producción de leche en función de la disponibilidad de calcio. Por lo que concluyen que el CaR de la glándula mamaria actuaría como un componente de un mecanismo protector contra la hipocalcemia durante la lactación (Van Houten *et al.*, 2004).

Por último, se ha visto que el PTH-rp es el responsable de la hipercalcemia asociada con diferentes tumores en personas y animales, actuando de forma similar a la PTH, al incrementar la reabsorción ósea y la retención renal de calcio (Rosol y Capen, 1997).

3.1.3.1.4.2. ESTRÓGENOS.

Son muy pocos los estudios en los que se ha valorado el papel de los estrógenos en la patogenia de la fiebre de la leche y, además, sus resultados son contradictorios. Así, Hollis *et al.* (1981) observaron que las vacas con hipocalcemia tenían una menor capacidad de reabsorción ósea que los individuos sanos, resultando las concentraciones de estrógenos significativamente más elevadas en los animales enfermos la única diferencia con respecto al grupo control. Lappeteläinen *et al.* (1993) coincidieron con esta observación y detectaron valores inferiores de hidroxiprolina (menor reabsorción ósea) en los animales enfermos, siendo los niveles de estradiol más altos en las vacas parécicas que en las control, aunque las diferencias no tuvieron significación estadística. No obstante, otros estudios discrepan de estas observaciones, no detectando diferencias significativas entre animales sanos y enfermos, llegando a sugerir que los estrógenos aumentaban la reabsorción ósea en vacas lecheras (Sasser *et al.*, 1979).

Los estrógenos, además de los efectos sistémicos y sobre los órganos de la reproducción, producen un aumento de la función osteoblástica en el hueso, limitando la reabsorción ósea, y evitando una excesiva desmineralización del esqueleto durante la gestación (Rodríguez, 1995; Guyton y Hall, 2006a). Además, incrementan la síntesis de calcitriol a nivel renal, lo que es muy importante para mantener el balance del calcio a lo largo de la gestación (Rosol y Capen 1997). Aunque el mecanismo por el que los estrógenos disminuyen la movilización ósea no está bien establecido, se cree que pueden tener un efecto antagónico a la acción de la PTH (Avioli, 1981).

3.1.3.1.4.3. GLUCOCORTICOIDES.

Dentro del grupo de hormonas que tienen un papel secundario en el control del metabolismo del calcio, los glucocorticoides son los que han recibido una mayor atención.

Estas hormonas poseen una acción catabólica sobre la matriz ósea, disminuyen el desarrollo del cartílago, pueden provocar la interrupción del crecimiento y finalmente inhiben la neoformación y remodelación ósea (Rodríguez, 1995; Guyton y Hall, 2006d). En grandes dosis, sus efectos se manifiestan a través de desórdenes en el metabolismo óseo que se traducen en osteopenia, pudiendo llegar a provocar fracturas espontáneas.

Los cambios originados por los glucocorticoides en el metabolismo óseo son un tema de gran interés en medicina humana. Así, se ha visto que un exceso de glucocorticoides

circulantes producen efectos adversos en el hueso (Manolagas y Weinstein, 1999; Cooper, 2004 y Canalis *et al.*, 2007) porque provocan un desacoplamiento entre la formación y reabsorción ósea, en favor de una pérdida de hueso (figura 4).

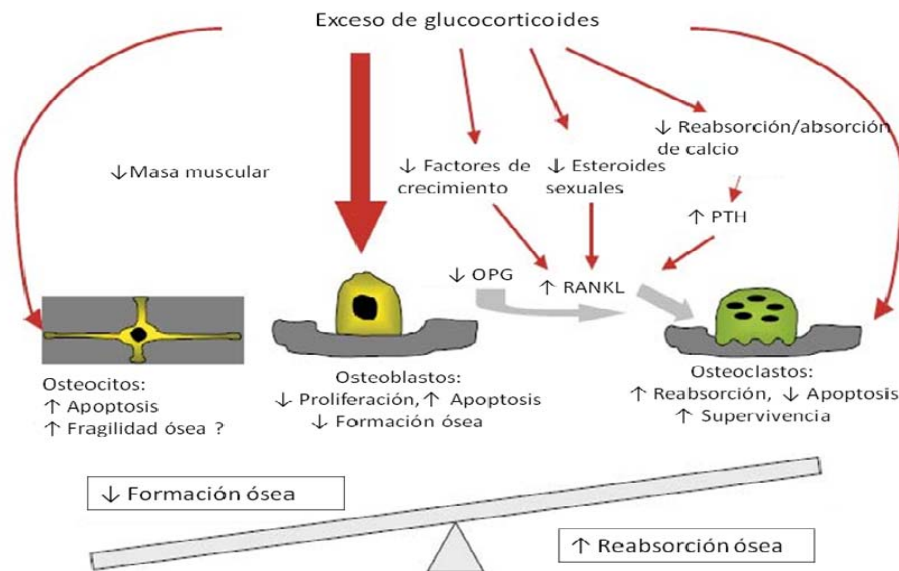


Figura 4: Mecanismos por los que un exceso de glucocorticoides tienen efecto en el hueso. (Modificado de Hardy y Cooper, 2009).

Estas hormonas causan una temprana y profunda reducción en la formación ósea a través de los efectos directos sobre los osteoblastos (Pearce *et al.*, 1998 y Cooper *et al.*, 2003). Provocan una disminución en la proliferación de los osteoblastos y en la producción de proteínas específicas de los osteoblastos (osteocalcina, fosfatasa alcalina (isoenzima ósea) y el telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo I) e incrementan la apoptosis (Bellows *et al.*, 1990; Weinstein *et al.*, 1998 y Eijken *et al.*, 2006). Un exceso de glucocorticoides produce un incremento en la reabsorción ósea a pesar de verse reducida la formación (Hofbauer *et al.*, 1999).

En medicina veterinaria, distintos trabajos y estudios plantean diversos resultados y opiniones. Así, Au (1975) propuso que el cortisol mejoraría la respuesta ante una disminución de los niveles sanguíneos de calcio, al detectar que esta hormona aumentaba la

secreción de PTH "in vitro". En contraposición, Chavassieux *et al.*, (1993) comprobaron, al comparar ovejas tratadas con metilprednisolona e individuos control, que los parámetros que reflejan la neoformación ósea estaban significativamente reducidos en los pacientes tratados con metilprednisolona y, sin embargo, no existían diferencias significativas en los niveles de PTH y calcio entre los dos grupos.

Otra posible actuación del cortisol frente a la hipocalcemia fue descrito por Horst y Jorgensen (1982), quienes, tras inyecciones sucesivas de cortisol en cabras, comprobaron que este no afectaba a la concentración de calcio, pero sí generaba una hipofosfatemia significativa. En vista de estos resultados, los autores plantearon la posibilidad de que los glucocorticoides podrían ejercer su efecto protector frente a la bajada de la calcemia al reducir la concentración de fósforo sanguíneo, lo que actuaría como estímulo para la síntesis de calcitriol, independientemente de la concentración de calcio en suero. Contrariamente a lo comentado con anterioridad, en vacas en decúbito los individuos con los niveles más altos de cortisol presentaron una recuperación más lenta, llegando incluso, en ocasiones, a no recuperarse (Nakao y Grunert, 1990). En consonancia con esta observación, en un trabajo con vacas parésicas, Fidalgo *et al.* (2000) encontraron que los animales que no respondían correctamente al tratamiento con sales de calcio mostraban unos niveles de cortisol significativamente más altos que los que sí mejoraban tras la terapia y, además, la concentración de vitamina D era levemente inferior en los animales con una mayor cortisolemia, aunque las diferencias no adquirieron significación estadística.

Otros experimentos destacan la presencia de valores significativamente más elevados de cortisol en vacas a las que se inducía hipocalcemia mediante la administración de EDTA-Na₂, al compararlas con animales sanos; sin embargo, estos autores no concretaron la importancia de este hallazgo en la fisiopatología de la paresia puerperal (Riond *et al.*, 1999). En otra línea de investigación, Espino *et al.*, (2005) observaron que la administración de dietas aniónicas en ovejas durante el periodo en torno al parto inducía la aparición de acidosis metabólica y de un hipercortisolismo moderado asociado a la ingesta de este tipo de ración si bien este incremento sólo fue estadísticamente significativo el día anterior al parto. Los autores plantean la hipótesis de que este incremento en la concentración de cortisol no juega un papel importante en las alteraciones del hueso asociadas a la ingestión de sales aniónicas.

A modo de resumen podemos concluir que el mecanismo por el cual los glucocorticoides tienen un efecto importante en la formación y reabsorción ósea, y su posible repercusión en enfermedades como la paresia puerperal todavía sigue siendo una incógnita.

3.2. PREVENCIÓN DE LA PARESIA PUERPERAL HIPOCALCÉMICA.

Dado que esta patología presenta una elevada repercusión económica y existe un gran número de animales que no responden al tratamiento tradicional con calcio, la investigación sobre esta enfermedad se centra en mejorar su profilaxis. Las estrategias que se han propuesto para reducir la incidencia de la paresia puerperal son múltiples y nosotros las hemos dividido en dos grandes grupos:

- 1) Administración exógena de determinados elementos que participan en la homeostasis cálcica.
- 2) Estrategias basadas en mantener activos los mecanismos endógenos encargados de regular la homeostasis cálcica.

3.2.1. ADMINISTRACIÓN EXÓGENA DE DETERMINADOS ELEMENTOS QUE PARTICIPAN EN LA HOMEOSTASIS CÁLCICA.

3.2.1.1. CALCIO VÍA ORAL.

Una de las medidas más empleadas en la prevención de la hipocalcemia es la aplicación de calcio por vía oral. El objetivo de este tratamiento es incrementar la absorción pasiva de este mineral desde el tubo digestivo, la cual es dependiente de la concentración de calcio en el lumen intestinal (Agger *et al.*, 2000b).

La captación intestinal de calcio tiene lugar por dos mecanismos (Goff y Horst, 1993).

- i. Transporte activo a través de las células epiteliales.
- ii. Difusión pasiva entre las células.

La absorción activa es estimulada por el calcitriol, y el transporte pasivo es dependiente del gradiente de concentración de calcio entre la luz del tubo digestivo y el líquido extracelular. Dado que la concentración de calcio iónico en el fluido extracelular es de aproximadamente 1 mM, lo que se intenta conseguir con la administración oral de este mineral, es obtener una concentración de calcio iónico en el intestino mayor de 1 mM para favorecer la difusión

pasiva (Bronner, 1987). En el ganado vacuno, la administración oral de compuestos de calcio incrementa el calcio sérico en animales normo e hipocalcémicos al cabo de los treinta minutos de su ingestión como consecuencia del transporte pasivo (Horst *et al.*, 2005).

Durante estos últimos años se llevaron a cabo diversos estudios con el fin de cuantificar la absorción neta de calcio en los distintos segmentos del tracto gastrointestinal. Así, en el análisis mostrado en la figura 5, el cual está basado en nueve estudios comparables, los segmentos pre-duodenales parecen ser los tramos más importantes en la absorción de los excesos de calcio (Schröder y Breves, 2006).

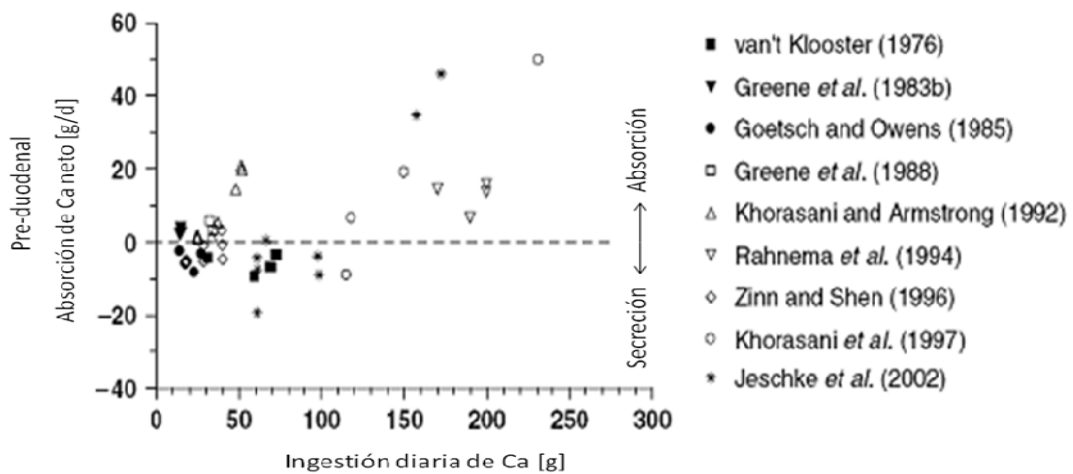


Figura 5: Absorción neta de calcio en los compartimentos pre-duodenales (incluyendo reticulorumen, omaso, abomaso, análisis de distintos trabajos). (Modificado de Schröder y Breves, 2006).

En relación a la prevención de la hipocalcemia a través de altas ingestiones de calcio, Lean *et al.*, (2006) demostraron en un meta-análisis, en el que incluyeron 137 trabajos que agrupan a 2.545 partos, que la prevención de esta patología es posible con altas ingestiones de calcio; lo que esto podría significar que la absorción de calcio desde los compartimentos pre-duodenales puede jugar un importante papel en la prevención de la hipocalcemia.

Aunque la presencia de mecanismos de absorción activa para el transporte de calcio podrían estar verificados para el rumen del ganado vacuno (Ricken, 2005), todavía hoy es desconocido el modo en que el transporte pasivo y la absorción activa contribuyen a la

absorción neta de calcio desde los compartimentos pre-duodenales. Así, en la figura 6 vemos que puede haber una correlación negativa entre la absorción pre-duodenal y la intestinal. Esto podemos interpretarlo de manera que si hay una secreción de calcio en los preestómagos/abomaso habría una mínima compensación por el calcio intestinal, resultando en un balance positivo en la mayoría de los experimentos. Es decir, que si ya hay una importante absorción de calcio desde los preestómagos, la absorción de calcio en el intestino será baja.

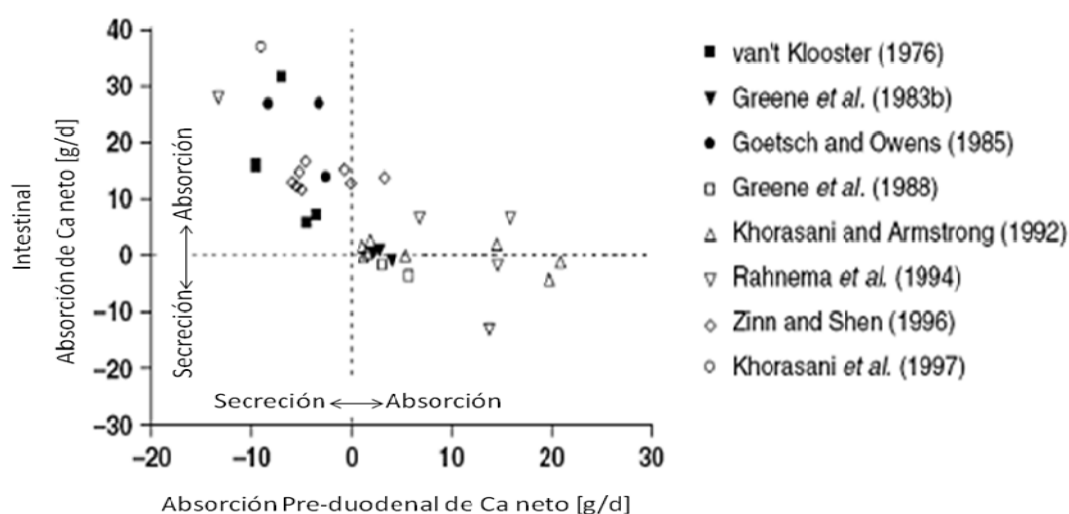


Figura 6: Absorción intestinal (incluyendo intestino delgado, ciego y colon). (Modificado de Schröder y Breves, 2006).

El calcio se puede administrar en diferentes sales, entre las que destacan el carbonato cálcico, óxido de calcio, propionato y cloruro cálcico. La cantidad de calcio que es captada tras la administración oral, está estrechamente correlacionada con la hidrosolubilidad de las diferentes sales, siendo las de cloro y propionato las que se absorben más rápido en comparación con los óxidos y carbonatos de calcio que presentan una solubilidad reducida en agua (Agger *et al.*, 2000b). El cloruro cálcico es la sal que aporta mayor cantidad de calcio y, además, incorpora cloruro, que es un anión fuerte, el cual va a provocar un descenso del pH sanguíneo, que a su vez facilita el aumento de la concentración de calcio iónico y crea unas condiciones óptimas para la acción de la PTH en diferentes tejidos (Goff, 2000).

La eficacia del calcio oral en la prevención de la hipocalcemia ha sido investigada a lo largo del tiempo, y así la primera aplicación exitosa de las sales de calcio por esta vía fue empleando el cloruro cálcico en 1970 en Suecia. Los autores describieron que las vacas que recibían estas sales presentaban una menor incidencia de la fiebre de la leche (Jonsson y Pehrson, 1970). Sin embargo, hasta 1993 no se recogió en ningún estudio el efecto de la administración de cloruro de calcio en los principales minerales séricos (Queen *et al.*, 1993). Estos investigadores detectaron un incremento en los niveles sanguíneos de calcio en las vacas tratadas en relación con los animales control. El aumento del mineral era evidente a los 5 minutos tras la ingestión del gel y se mantenía hasta las 6 horas postadministración. Los autores propusieron que durante los 15 primeros minutos la absorción se producía a nivel de la gotera esofágica y abomaso y 1-2 horas después aparecería un segundo pico correspondiente a la captación de calcio en el intestino delgado. Posteriormente, Oetzel (1996a) confirmó esta observación, administrando una dosis de cloruro cálcico (50 gr de Ca^{+2}) preparto y dos posparto (100 gr de Ca^{+2}) a 204 vacas, tras lo cual observaba una reducción significativa en la incidencia de la fiebre de la leche y desplazamiento de abomaso a la izquierda.

La aplicación de la dosis preparto es esencial para obtener una buena profilaxis; así Hernández *et al.* (1999) no encontraron diferencias significativas en los niveles de calcio y fósforo sanguíneo, entre las vacas que sólo recibían una dosis de cloruro cálcico a las 24 y 48 horas posparto y las vacas control. Además, en este trabajo no obtuvieron resultados satisfactorios en su intento de reducir la incidencia de la retención de placenta, metritis y la mejora de las tasas de reproducción y producción láctea en vacas tratadas con geles de cloruro cálcico.

En cuanto al empleo cloruro cálcico en pasta y su eficacia para disminuir la incidencia de la fiebre de la leche, diversos investigadores (Agger *et al.* 1997, Agger 1998 y Agger *et al.*, 2000a) hallaron una reducción del 70% de esta patología. Con respecto a la utilización de sales de propionato sólo un estudio lo empleó como pasta con una eficacia de 42% (Goff *et al.*, 1996) y como bolo tuvo un efecto preventivo del 30% (Pehrson *et al.*, 1998).

Por último, en un experimento realizado en Suiza (Braun *et al.*, 2008) comprobaron la eficacia de la administración de cloruro cálcico o fosfato sódico solos o combinados y comprobaron que las vacas tratadas con ambas sales tenían una menor incidencia de hipocalcemia.

La única nota discordante, respecto a la necesidad de dar una dosis antes del parto para reducir la incidencia de la hipocalcemia posparto, la constituyen los datos que expusieron Dhiman y Sasidharan (1999). Estos investigadores obtuvieron una buena eficacia con cloruro cálcico aplicando la primera dosis de calcio dos horas después del parto y la segunda, aproximadamente, 12 horas después de la primera. Los resultados obtenidos fueron una reducción en el número de animales con fiebre de la leche (3 casos en el grupo control y 1 caso en el lote con tratamiento) y, además, la calcemia fue significativamente mayor en las vacas con tratamiento.

Otra alternativa, para el empleo de sales de calcio por vía oral la constituyen los bolos intrarruminales. Utilizando 11 vacas de alta producción con antecedentes de paresia puerperal, Alonso y González (1997) comprobaron que la administración de 4 bolos (1 bolo = 125 gr CaCl_2 + 45 gr CaSO_4), coincidiendo el primero con los primeros síntomas del parto y el último 24 horas después del mismo, ninguna de ellas mostró signos clínicos de hipocalcemia. Así mismo, Sampson *et al.* (2009) aplicaron un bolo inmediatamente después del parto y otro a las 12 horas y observaron un aumento del calcio iónico y un descenso del pH urinario.

La utilización de sales de calcio no está exenta de efectos adversos, y las principales limitaciones para su empleo generalizado son las siguientes:

1. Las soluciones acuosas de cloruro cálcico son productos muy irritantes y cáusticos. Así, durante su administración es frecuente observar un incremento de la salivación y lagrimeo, aunque estos efectos son transitorios y suelen desaparecer durante los 5 minutos postadministración (Queen *et al.*, 1993; Agger *et al.*, 2000b). Sin embargo, se han descrito otras lesiones más graves como la aparición de úlceras de gran tamaño en la mucosa del tracto digestivo, fundamentalmente en faringe, esófago, preestómagos y abomaso (Wentink y Tsgam, 1992).

Debido a los problemas que provocaban los preparados de cloruro cálcico en solución, la mayoría han sido retirados del mercado europeo. En el intento de solventar las limitaciones planteadas por estas formulaciones se han desarrollado geles y pastas con cloruro cálcico y propionato cálcico. Así, Agger *et al.* (2000b) detectaron sólo una ligera hiperemia en la mucosa digestiva a nivel del rumen y abomaso en cuatro animales que habían recibido cloruro cálcico en una pasta con excipiente lipídico. Esto confirma la reducción en el poder irritante de estas nuevas

formulaciones; sin embargo, el inconveniente de estas nuevas preparaciones farmacéuticas es que se incrementa el riesgo de provocar neumonía por aspiración debido a su mayor viscosidad (Oetzel, 1996b). Así, Philipsen en 1990, ya publicó un caso de esta patología con desenlace fatal en una vaca que había recibido una dosis de la pasta de cloruro cálcico.

2. La administración masiva de calcio exógeno puede frenar la movilización de calcio endógeno, puesto que permanecen inactivos los mecanismos homeostáticos encargados de responder a situaciones de demanda elevada de este mineral (Agger *et al.*, 2000a).

3. El cloruro cálcico, cuando se utiliza a una dosis elevada, puede inducir acidosis metabólica; esta alteración va a reducir la ingesta de alimento lo que predispone a los animales a padecer otras patologías, principalmente cetosis (Goff y Horst, 1994). Para resolver este inconveniente fue ideado el propionato de calcio, ya que posee una mejor palatabilidad que las sales de cloro y no es un anión fuerte, disminuyendo el riesgo de acidosis metabólica. Además, es un precursor gluconeogénico, lo que ayudaría a prevenir la cetosis (Rings *et al.*, 1997). La limitación de este preparado es que aporta menos cantidad de calcio y que se absorbe de forma más lenta, por lo que se necesitan dosis mayores. Incluso, Breukink (1991) observó que el propionato reducía las contracciones del abomaso, lo que incrementaba el riesgo de distensión y desplazamiento de este órgano.

4. Por último, conviene destacar que en la investigación llevada a cabo por Ostergaard *et al.* (2004), en la que estudiaron los efectos económicos de distintas estrategias de prevención de la hipocalcemia en 24 granjas comerciales y observaron un mayor beneficio económico en aquellas que utilizaban sales aniónicas que aquellas que en las sólo se utilizaba calcio oral. También, aunque algún autor propuso la combinación de sales aniónicas y calcio oral (Sorensen *et al.*, 2002b) se ha demostrado que los posibles beneficios de esa combinación no parecen justificar ese gasto a mayores (Melendez *et al.*, 2002 y Ostergaard *et al.*, 2004).

Teniendo en cuenta alguna de las limitaciones que presenta la utilización de sales de calcio por vía oral, en otras investigaciones se propusieron otras dos rutas alternativas que son la vía rectal y la infusión intramamaria, pero ninguna de ellas ha tenido aplicación en la práctica rutinaria en granjas comerciales.

3.2.1.2. PTH.

En 1925, Dyerre y Greig plantearon una hipótesis según la cual la fiebre de la leche tendría su origen en una secreción insuficiente de PTH. Después de esta observación, Hibbs *et al.* (1947) y Jackson *et al.* (1962) inyectaron extractos crudos de glándulas paratiroides a diferentes vacas, constatando que los individuos viejos tenían menor respuesta que los animales jóvenes, y concluyeron que esta hormona no prevenía la fiebre de la leche. Años después, en 1986, Goff *et al.* consiguieron una reducción en la incidencia de la fiebre de la leche en animales que recibían PTH en infusión intravenosa durante 96 horas preparto. En estos animales, hallaron una elevación de la concentración sanguínea de calcio originada por dos posibles vías: por un lado, debido a un aumento de la reabsorción ósea que se detectaba a las 48 horas posinfusión, al observar un incremento de los niveles de hidroxiprolina en sangre y, por el otro, encontraron un ascenso de la concentración sanguínea de calcitriol, a las 16 horas de infusión, que favorecería la absorción de calcio intestinal.

A pesar de estos resultados esperanzadores, este método preventivo no ha pasado de la fase experimental, ya que para su aplicación utilizaron sistemas de infusión colocados bajo la piel, en el cuello o fosa paralumbar, y conectados a la vena yugular o ilíaca, respectivamente, lo que dificultaba y encarecía su empleo de forma rutinaria. Concluyeron que para una prevención exitosa se necesitaría una infusión de al menos 60 horas antes del parto, y el único efecto secundario señalado era la reducción de la ingesta en los momentos de hipercalcemia más elevada que aparecían entre las 72 y 96 horas posinfusión.

Tras este primer experimento favorable con el uso de PTH intravenosa, Goff *et al.* (1989) estudiaron la eficacia de esta hormona inyectada por vía intramuscular, con esta nueva forma de administración se resolvía la dificultad y el coste que suponen las bombas de infusión. En este trabajo, realizaron una inyección de PTH cada 8 horas, desde el día 6 preparto hasta el día 6 posparto, reduciendo gradualmente la dosis posparto para evitar la aparición de hipocalcemia al detener la aplicación de la hormona. Con esta pauta de disminución progresiva de la dosis, sólo describieron un descenso transitorio en los niveles de calcio durante las 24 horas después de la supresión del tratamiento.

Aunque el mecanismo de acción de la PTH es el mismo, independientemente de la vía por la que es administrada, hay grandes diferencias entre la utilización de la vía intravenosa o intramuscular, en términos de la profilaxis de la fiebre de la leche. Se necesita una dosis

unas 20 veces mayor en la inyección intramuscular que en la intravenosa, lo que incrementa el coste y, además, aumenta el riesgo de aparición de reacciones adversas (Goff *et al.*, 1989). La sobredosificación de esta hormona se asoció con una hipercalcemia severa y aparición de calcificación en órganos internos. También se publicaron reacciones agudas con muerte por shock anafiláctico (Pang, 1980) y, por este problema, Goff *et al.* (1989) se vieron en la obligación de eutanasiar uno de los animales que recibía las inyecciones de PTH. Sin embargo, no hallaron signos compatibles con los efectos secundarios descritos con anterioridad, por lo que sospecharon que el uso de dosis altas de PTH, de forma repetida, podía provocar problemas graves; no obstante, no averiguaron cuál sería el posible mecanismo fisiopatológico.

3.2.1.3. VITAMINA D Y SUS METABOLITOS.

Desde el conocimiento del papel de la vitamina D en la regulación de la homeostasis cálcica, ya se planteó la posibilidad de utilizarla en el control de las concentraciones sanguíneas de calcio (Taylor *et al.*, 1934, citado por Murray *et al.*, 2008). Así desde mediados de los años cincuenta se han probado diferentes compuestos derivados del colecalciferol. En uno de los primeros trabajos administraron dosis altas de calcidiol, por vía oral durante varias semanas antes del parto (Hibbs y Pouden, 1955). El problema de esta terapia es que tuvo un éxito parcial debido a las complicaciones tóxicas cuando los valores plasmáticos sobrepasan la concentración de 300ng/ml (Jones, 2008), y, en algunos casos, una respuesta tardía al tratamiento. A partir de este momento, surgieron otros trabajos donde se seleccionaron metabolitos, más potentes y de acción más rápida, como el calcitriol y el 1- α -(OH)D₃. Este último compuesto es un análogo sintético del calcitriol, que precisa de una hidroxilación en el carbono, 25 a nivel hepático, para alcanzar su máxima actividad (Bar y Sachs, 1980).

El calcitriol y el 1- α -(OH)D₃ se aplicaron en la mayoría de los trabajos por vía intramuscular y producían un incremento en la absorción intestinal de calcio (Moate *et al.*, 1987). Estos autores observaron una mayor captación de calcio en el tracto gastrointestinal, tanto en vacas sanas como hipomagnesémicas, lo que confirmaba el uso potencial del dihidroxicolecalciferol, inoculado por vía subcutánea, para la prevención y tratamiento de la fiebre de la leche. Otros autores destacaron también el manejo con éxito de estos compuestos por vía oral (Hove y Kristiansen, 1984) y por vía vaginal (Okura *et al.*, 2007).

Para comprender mejor porque los componentes exógenos de vitamina D ayudan a la prevención de la hipocalcemia describiremos brevemente el mecanismo de acción del

calcitriol (figura 7). En condiciones fisiológicas, la mayor parte del calcitriol circula en la sangre unido a la proteína transportadora DBP (Bikkle *et al.*, 1985) y menos del 5% de calcitriol lo hace en estado libre (Bikkle *et al.*, 1984). La forma libre entra en las células diana unida al receptor para calcitriol (VDR). Ahí, este complejo es fosforilado y combinado con un factor accesorio nuclear, el cual se ha determinado que es un receptor de la familia del ácido retinoico (RXR), formaría la unión VDR/RXR (Hausler *et al.*, 1995). Este complejo tiene una gran afinidad por las secuencias génicas conocidas como elementos de respuesta a la vitamina D (VDRES, del inglés vitamin D response elements) y está presente en la región promotora del calcitriol mediada por la transcripción genes. Así, al alterarse la expresión de estos genes provocaría una modificación en las células diana y, finalmente, la expresión biológica de los efectos de la presencia del calcitriol. También una de las acciones del $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ es que inactiva la enzima 24-hidroxilasa (Hausler *et al.*, 1995). Por último, se ha sugerido que la PTH podría *in vitro* disminuir la regulación de los receptores intracelulares de calcitriol; aunque, en vacas con hipocalcemia hay suficiente estímulo para incrementar la síntesis de PTH directamente (Horst *et al.*, 1994).

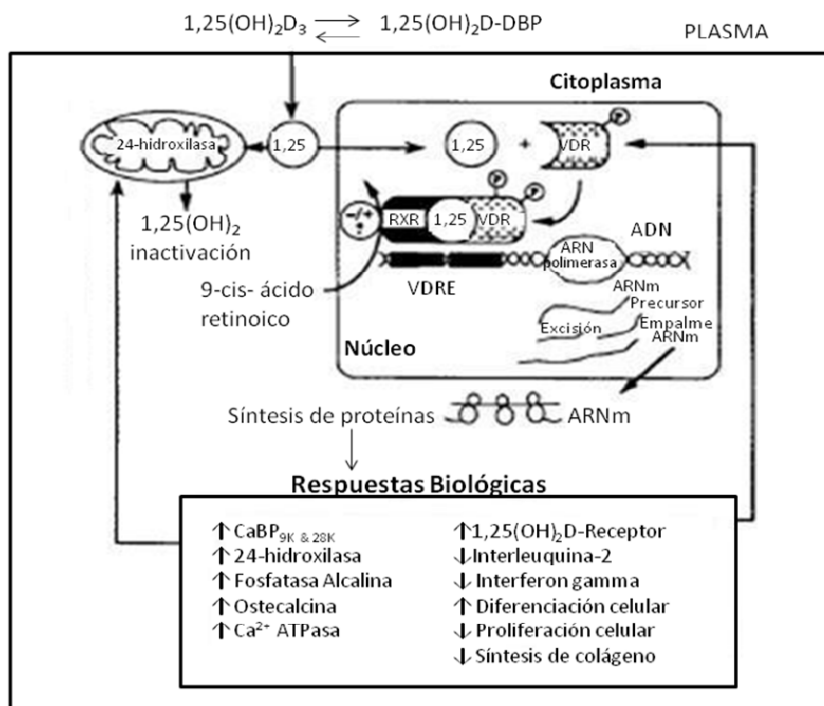


Figura 7: Mecanismo celular de la acción del calcitriol. (Modificado de Horst *et al.*, 2003).

A pesar de los resultados esperanzadores del tratamiento con la vitamina D y sus metabolitos, se han descrito tres grandes problemas que limitan el uso rutinario:

1. La primera dificultad es determinar el momento exacto de la inyección de la vitamina D. Se recomienda aplicarla entre el día 4 y 1 parto (Gast *et al.*, 1979; Bar *et al.*, 1988; Sachs *et al.*, 1997), ya que se necesitan unas 24 horas para activar la absorción intestinal de calcio y, por otra parte, los niveles sanguíneos de vitamina D sólo permanecen elevados durante 48-72 horas postinyección (Bar y Sachs, 1980). Cuando la aplicación es tardía, carece de efectos profilácticos; y si se administra de forma excesivamente precoz obliga a utilizar nuevas dosis, lo que encarece el tratamiento e incrementa el riesgo de calcificación de tejidos blandos (Petrie y Brezee, 1977; Morrissey y Cohn, 1978; Littledike y Horst, 1982). Bar y Sachs (1980) intentaron adecuar el momento de la inyección induciendo el parto con el uso de flumetasona o bien prolongar el efecto de la vitamina D, hasta 10 ó 11 días, utilizando dosis elevadas de esta hormona. A pesar de los buenos resultados experimentales (control: 36% paresia puerperal. Animales tratados: 0% paresia puerperal), ninguna de las dos opciones se está aplicando de forma rutinaria en condiciones de campo.

2. El potencial tóxico es otro de los grandes problemas del uso de la vitamina D y sus compuestos. Para intentar reducir su toxicidad, se preconiza el empleo de dosis más bajas durante un período de tiempo más amplio; sin embargo, esto supone un manejo excesivo de los animales durante el parto. Con el propósito de minimizar estas limitaciones, Goff y Horst (1990) desarrollaron un implante subcutáneo, de liberación lenta, con 24-F-1,25(OH)₂D₃. Dicho implante se colocaba bajo la piel, a nivel de la fosa paralumbar, aproximadamente una semana antes del parto, y liberaba de forma progresiva el compuesto activo. En este experimento, los resultados fueron muy satisfactorios consiguiendo un descenso de la incidencia de la fiebre de la leche, en el momento del parto, del 80% observado en los animales control a <10% en los que recibían el tratamiento. A pesar de la aparente efectividad de este compuesto, su utilización no ha superado la fase experimental.

3. El tercer gran problema, y quizás el más importante, es la aparición de signos clínicos de hipocalcemia a los 10-14 días posparto en los animales tratados con vitamina D (Goff *et al.*, 1988; Goff y Horst, 1990). Beckman *et al.* (1995) corroboraron

que los animales tratados con vitamina D exógena presentaban niveles sanguíneos más bajos de calcitriol, que aquellos a los que se les incentivaba la producción endógena de esta hormona con el uso de dietas pobres en calcio. Los autores observaron que la administración de vitamina D disminuía la sensibilidad de la 1- α -hidroxilasa renal a la acción de la PTH, de forma que se reducía la producción de calcitriol endógeno. Además, descubrieron un aumento de la actividad de la 24- α -hidroxilasa, a nivel renal e intestinal, y como esta enzima es la encargada de la degradación del calcitriol, observaron que se acortaba la vida media de la hormona circulante (Beckman *et al.*, 1995).

Para intentar paliar los efectos negativos y tóxicos de la utilización de los metabolitos de la vitamina D, Wilkens *et al.* (2012) realizan un estudio en el que emplean una dosis oral diaria de calcidiol de 3 mg por vaca combinado con una dieta con una DCAD negativa. El planteamiento de este trabajo consistió en administrar 25(OH)D₃ diez días antes de la fecha de parto. Para ello se establecieron cuatro grupos: dieta control (sin 25(OH)D₃), dieta control (con 25(OH)D₃), dieta con DCAD negativa (sin 25(OH)D₃) y dieta con DCAD negativa (con 25(OH)D₃). Estos investigadores observaron una correlación lineal entre la concentración plasmática del calcidiol y la duración del tratamiento, confirmándose una absorción efectiva en los animales suplementados. Lo que constatan estos autores es que el tratamiento solo con calcidiol oral podría tener un efecto negativo en la calcemia posparto de los animales viejos. Con respecto a la concentración de calcio iónico entre los días -4 pre y 4 posparto fue significativamente mayor en el grupo que recibió la dieta aniónica y la suplementación oral de calcidiol. En recientes investigaciones, se han confirmado efectos directos del 25(OH)D₃ sobre la reabsorción ósea (Kogawa *et al.*, 2010) por lo que este tratamiento podría mejorar el contenido en calcio de hueso. Así, ya que por una parte las vacas tratadas con calcidiol oral tendrían unos mayores depósitos de calcio óseo y, a su vez, los animales que reciben una dieta aniónica se beneficiarían de una mejor sensibilidad de los tejidos sensibles a la PTH, lo cual mejoraría la movilización de calcio desde el hueso al plasma. Wilkens *et al.* (2012) postulan que la combinación de una suplementación con calcidiol oral y una dieta aniónica sería una buena medida de prevención de la hipocalcemia.

3.2.2. ESTRATEGIAS BASADAS EN MANTENER ACTIVOS LOS MECANISMOS ENDÓGENOS ENCARGADOS DE REGULAR LA HOMEOSTASIS CÁLCICA.

3.2.2.1. ADMINISTRACIÓN DE DIETAS BAJAS EN CALCIO.

Esta medida de profilaxis ha sido empleada a lo largo de los últimos 50 años durante el periodo de secado de la vaca, con excelentes resultados aportados por los estudios de distintos investigadores (Boda *et al.*, 1954; Goings *et al.*, 1974; Wiggers *et al.*, 1975; Green *et al.*, 1981; Kichura *et al.*, 1982).

Este método preventivo se basa en el uso de raciones con un nivel de calcio inferior a las necesidades del animal en el último tramo de la gestación. Al ingerir menos cantidad de calcio de la necesaria, la vaca no cubre las necesidades fisiológicas y del desarrollo fetal. Así, ante este balance negativo, se activa la producción de hormonas calciotrópicas, principalmente, PTH y calcitriol. Para que se observe un aumento significativo de la actividad de la glándula paratiroides es necesario que la ingesta de calcio sea inferior a los 20 gr/día (Horst *et al.*, 1997; Houe *et al.*, 2001).

Los beneficios de esta estrategia dietética sólo son evidentes cuando esta ración se emplea al menos durante siete días antes del parto. Como norma general, se recomienda comenzar su utilización entre 2 a 3 semanas preparto, y con este tiempo de consumo se detectaron reducciones de la tasa de incidencia de la fiebre de la leche del 38 y 33 % al 0% (Goings *et al.*, 1974; Wiggers *et al.*, 1975).

Sin embargo, este método no está exento de algunos inconvenientes. Así, largas exposiciones a niveles elevados de PTH reducen la sensibilidad de los tejidos diana a esta hormona (Goff, 2008). También, para intentar reducir los niveles de calcio hay que restringir la utilización de forrajes de leguminosas, como la alfalfa, a favor, por ejemplo del silo de maíz, lo que puede provocar un engrasamiento excesivo de los animales en el período preparto, originar cambios repentinos del forraje de la dieta tras el parto e incrementar la incidencia del desplazamiento de abomaso (DeBlas *et al.*, 1999).

Un problema adicional es que esta medida preventiva no es siempre eficaz. En este sentido, Goff y Horts (1997) han demostrado que la incidencia de la hipocalcemia está relacionada no sólo con el contenido de calcio de la dieta, sino también con el de potasio. En su experimento, estos investigadores comprobaron que los animales alimentados con una

cantidad baja de calcio, pero a los que se elevaba el nivel de potasio a un 2,1%, pasaban de una incidencia de la fiebre de la leche de 0 al 36%, demostrando que la aparición de la paresia puerperal hipocalcémica no dependía sólo de la concentración de calcio en la ración sino que también está en función de los niveles de otros minerales.

Pero el principal problema es que en condiciones de granja es muy difícil conseguir raciones con un nivel de calcio inferior a 20 gr/día (Thilsing-Hansen *et al.*, 2002b; Graberr *et al.*, 2009). Para intentar conseguir estos bajos niveles de calcio se han propuesto tres alternativas:

1. La incorporación de Zeolita (un aluminio silicato, como por ejemplo clinoptilolita). Este compuesto se une al calcio y forma un complejo que es expulsado a través de las heces. Los inconvenientes de este método es que se necesitan ingerir grandes cantidades (varían entre 0,25-1 kg/día durante dos semanas preparto) y, además, la zeolita también podría tener un efecto adverso sobre la absorción de fósforo (y posiblemente sobre minerales traza) el cual no podría suplementarse con fósforo extra en la dieta (Thilsing-Hansen *et al.*, 2002a; Katsoulos *et al.*, 2005; Pallesen *et al.*, 2007; Thilsing *et al.*, 2007). Aunque, teóricamente, la modificación química de la zeolita es posible para aumentar la afinidad y la especificidad por el calcio por lo que su empleo práctico sería posible.
2. El segundo método sería añadir aceites vegetales en la ración, los cuales se unirían al calcio formando jabones insolubles (Wilson, 2003). Aunque esto es cuestionable ya que, en los rumiantes, estos jabones insolubles pueden ser disociados en el duodeno (Doreau y Ferlay, 1994). Otra desventaja de este método es que la alimentación con grasas antes del parto afecta negativamente a la ingestión de materia seca (Douglas *et al.*, 2004).
3. El último sistema para disminuir la disponibilidad de calcio está basado en un compuesto natural proveniente del salvado de arroz, el ácido fítico. El salvado de arroz contiene una gran cantidad de ácido fítico y presenta *in vitro* un gran potencial de unión (20 g Ca/kg salvado de arroz) (Siener *et al.*, 2001). Ha sido empleado en los humanos para disminuir la disponibilidad de calcio de la dieta con el fin de prevenir cálculos renales (Ohkawa *et al.*, 1984, Ebisuno *et al.*, 1991). En el rumen, el ácido fítico es degradable (Clark *et al.*, 1986), por lo que debe de ser protegido por distintos tratamientos (Martín-Tereso *et al.*, 2009, Martín -Tereso *et al.*, 2010a). Esta

protección puede inducir la adaptación del metabolismo del calcio en las vacas (Martin-Tereso *et al.*, 2010a), debido a que la dieta presenta un bajo contenido en calcio y una baja disponibilidad de este mineral (Martín -Tereso *et al.*, 2011). El valor profiláctico de este método en la prevención de la hipocalcemia está en fase de estudio y los resultados preliminares indican que la protección ruminal del salvado de arroz mejoraría la calcemia después del parto (Martín -Tereso *et al.*, 2010b).

3.2.2.2. ADMINISTRACIÓN DE SALES ANIÓNICAS EN EL PREPARTO.

El empleo de las sales aniónicas comienza en el año 1962 cuando un grupo de científicos noruegos realizó uno de los hallazgos más significativos, y todavía no bien comprendidos, en la selección de las modificaciones de la dieta para prevenir la fiebre de la leche (Ender *et al.*, 1962). Estos investigadores descubrieron que dietas de preparto ricas en sodio y potasio (cationes) y bajas en cloro y azufre (aniones) incrementaban significativamente la incidencia de hipocalcemia; mientras que las dietas ricas en aniones y bajas en cationes reducían significativamente el número de animales que desarrollaban hipocalcemia en el posparto (Ender *et al.*, 1962, 1971; Dishington, 1975; Dishington y Bjornstad, 1982). Si bien los resultados obtenidos fueron buenos, no fue hasta el año 1984, cuando Block revivió el interés de la aplicación de las sales aniónicas en la prevención de la fiebre de la leche al encontrar una reducción del 47 % en la incidencia de esta enfermedad en los individuos que consumían este suplemento dietético que modificaba únicamente la dieta en las cantidades de cloro, azufre y sodio. Estudios posteriores confirmaron que las dietas posparto que contenían altas concentraciones de cloro y azufre podrían reducir el riesgo de hipocalcemia (Oetzel *et al.*, 1988; Gaynor *et al.*, 1989; Leclerc y Block, 1989; Goff *et al.*, 1991; Beede *et al.*, 1992; Phillippo *et al.*, 1994) y que dietas ricas en potasio incrementarían la incidencia de esta patología (Horst *et al.*, 1997).

Así, desde que se conocen los efectos de estas sales son numerosos los trabajos en los que se valoran las ventajas e inconvenientes de su empleo no sólo en la prevención de la hipocalcemia en vacas de alta producción láctea, sino también en el estudio de la ganancia de peso en cerdos y pollos (Sauveur y Mongin, 1978; Yen *et al.*, 1981).

El uso de esta estrategia dietética se basa en la teoría de “iones fuertes” del balance ácido/base de Singer y Hastings (1948) y modificada por Stewart (1983).

La teoría de Stewart se asienta en dos postulados básicos que son:

- El número de moles de partículas con carga positiva (cationes) en cualquier solución debe ser igual al número de moles de partículas con carga negativa (aniones) presentes en la misma:

$$n^{\circ} \text{ cationes} = n^{\circ} \text{ aniones.}$$

- El producto de la concentración de iones hidrógeno e iones hidróxilo debe ser igual a la constante de disociación del agua, aproximadamente 1×10^{-14} :

$$[\text{H}^+] \times [\text{OH}^-] = 1 \times 10^{-14}.$$

Además, ambas condiciones deben cumplirse al mismo tiempo.

Debido a que el pH de una solución es el logaritmo negativo de la concentración de protones, el empleo de esta teoría implica que el pH de dicha solución es dependiente de la diferencia entre el número de cationes y aniones presentes en la misma. Si se añaden partículas con carga positiva a una solución, como es el plasma, el número de protones tendrá que disminuir y el número de iones hidroxilo aumentar para mantenerla electroneutralidad de la solución (por lo tanto el plasma se volvería alcalino). En el caso contrario, la adición de aniones provoca un incremento en el número de iones de hidrógeno y descenso en los iones hidróxilo para mantener la electroneutralidad y por tanto disminuye el pH (el plasma se volvería ácido).

Para poder predecir el pH del plasma, Constable en 1999, basándose en esta misma teoría, propuso que el pH del plasma está determinado por cuatro factores independientes:

- La presión parcial de CO_2 ($p\text{CO}_2$).
- La solubilidad del CO_2 en el plasma (S), la cual es dependiente de la temperatura.
- La carga neta de los "iones fuertes" o la diferencia entre dichos iones $[(\text{SID}^+)]$.
- La concentración plasmática total de tampones débiles no volátiles, principalmente albumina, globulina y fosfato $[(A_{\text{TOT}})]$.

De modo que la ecuación para predecir el pH del plasma sería:

$$\text{pH} = \text{pK}'_1 + \log \frac{[\text{SID}^+] - K_a[A_{\text{TOT}}]}{S * \text{pCO}_2 (K_a + 10^{-\text{pH}})}$$

Donde pK'_1 es el ión producido por el agua, K_a es la constante de disociación plasmática de los ácidos débiles no volátiles, $[\text{SID}^+]$ es la diferencia entre los iones fuertes, $[A_{\text{TOT}}]$ es la concentración plasmática de los tampones débiles no volátiles, S es la solubilidad del CO_2 en el plasma y pCO_2 es la presión parcial de CO_2 en el plasma.

Por lo tanto, atendiendo a esta ecuación, podemos observar que para que disminuya el pH plasmático se tiene que producir: un incremento de la temperatura corporal, lo cual aumentaría la solubilidad del CO_2 en el plasma (S); un incremento de presión parcial de CO_2 en el plasma (pCO_2), lo que conllevaría a una acidosis respiratoria; una disminución de la concentración plasmática de los tampones débiles no volátiles $[A_{\text{TOT}}]$; o bien disminución de la diferencia entre los “iones fuertes” $[\text{SID}^+]$.

Los “iones fuertes” consisten en cationes (Na^+ ; K^+ ; Mg^{2+} ; Ca^{2+} y NH_4^+) y en aniones (Cl^- ; SO_4^{2-}) (De Garis y Lean, 2008). Con respecto a los cationes, los que están presentes en mayor concentración en la dieta de la vaca de leche y su respectiva carga son el $\text{Na}^{(+1)}$, $\text{K}^{(+1)}$, $\text{Ca}^{(+2)}$ y $\text{Mg}^{(+2)}$. En cuanto a los aniones se encontrarían el $\text{Cl}^{(-1)}$, el $\text{SO}_4^{(-2)}$ y el $\text{PO}_4^{(-3)}$ (Goff, 2006). En teoría todos los cationes y aniones presentes en la dieta son capaces de ejercer una influencia sobre la carga eléctrica y por lo tanto sobre el pH plasmático. Para que esto pueda suceder deben de ser absorbidos y llegar al plasma. Así, sabemos que los elementos traza se absorben en una cantidad tan pequeña que no afectan al equilibrio ácido-base. Tampoco los ácidos orgánicos, como los ácidos grasos volátiles, no tienen ningún efecto porque se absorben de forma indisociable y se transportan al hígado donde se metabolizan rápidamente (Goff, 2006). De ahí se deduce que la diferencia en el número de equivalentes de aniones y de cationes, disponibles en la dieta, determina el estado ácido-base del individuo. Los animales se encontrarían en un estado de acidosis si predomina la absorción de aniones, mientras que pasarían a una situación de alcalosis en el caso de que fuese mayor la absorción de cationes (Horst *et al.*, 1997).

Aplicando la teoría de la diferencia catiónica-aniónica de la dieta (DCAD) para prevenir la hipocalcemia debemos reducir la diferencia de los “iones fuertes” ([SID⁺]) y así, consecuentemente bajará el pH plasmático produciendo una acidosis metabólica. Para que se produzca esta disminución deseada del pH podemos añadir sales aniónicas a la dieta, las cuales se definen como sales ricas en aniones fijos, no metabolizables a formas más sencillas, cargados negativamente (sobre todo Cl⁻ y S⁻²) en relación a los cationes con cargas positivas (Na⁺ y K⁺) (Gant *et al.*, 1998).

La diferencia cuantitativa entre los iones de la dieta nos permite calcular el poder ácido o básico de una dieta. A lo largo de nuestra revisión bibliográfica hemos recogido diferentes denominaciones para esta diferencia:

- ❑ Alkali-alcalinidad. Fue el utilizado por los primeros investigadores en este tema (Dishington, 1975).
- ❑ Balance catiónico-aniónico para Block (1984) y Goff y Horst (1997).
- ❑ Balance electrolítico de la dieta: más empleado en la nutrición de pollos y cerdos (Sauveur y Mongin, 1978; Yen *et al.*, 1981).
- ❑ Diferencia de iones fijos según Fredeen *et al.* (1988a).
- ❑ Diferencia catiónica-aniónica de la dieta: es el término que tiene una mayor aceptación en todos los trabajos de esta última década (Pehrson *et al.*, 1999; Rérat *et al.*, 2009).

De todo lo comentado con anterioridad, se deduce que las propiedades acidificantes de las distintas sales dependen de la absorción preferencial de los diversos iones. De este modo, el cloruro sódico y el cloruro potásico se consideran compuestos neutros ya que el cloro, sodio y el potasio se absorben con la misma eficiencia, así cada molécula de sodio se acompaña de una de cloro y cada molécula de potasio se acompaña de una de cloro. La teoría de “iones fuertes” propuesta por Stewart sugiere que el sodio y potasio tienen la misma capacidad de alcalinizar la sangre ya que se absorben casi en su totalidad. El calcio, magnesio y el amonio son también cationes fuertes que serían capaces de aumentar el pH sanguíneo; sin embargo, su absorción es más reducida que la del sodio y potasio (38 y 28% respectivamente), lo que hace que tengan menor poder como agentes alcalinizantes (Horst *et al.*, 1997). Así, el cloruro cálcico (CaCl₂) es una sal acidificante porque la absorción del

cloro de la ración es de más del 90% mientras que la del calcio es menor del 40% (NRC, 1985).

La variación observada en la captación intestinal de los diferentes iones provocó cierta incertidumbre, en estos últimos años, a la hora de elegir cuáles son los iones que se deben incluir en el cálculo de la diferencia catiónica-aniónica de la dieta y por ende surgieron distintas fórmulas para el cálculo de la DCAD.

A continuación, enumeramos las principales ecuaciones propuestas en la bibliografía para el cálculo de la DCAD en vacuno lechero:

1. DCAD: $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - (\text{Cl}^- + \text{S}^{-2})$ mEq/kg MS (Ender *et al.*, 1962; Block, 1984).
2. DCAD: $(\text{Na}^+ + \text{K}^+ + 0,38 \text{Ca}^{+2} + 0,30 \text{Mg}^{+2}) - (\text{Cl}^- + 0,60 \text{S}^{-2} + 0,50 \text{P}^{3-})$ mEq/kg MS (Tucker *et al.*, 1991; Oetzel y Goff, 1999).
3. DCAD: $(\text{Na}^+ + \text{K}^+ + 0,38 \text{Ca}^{+2} + 0,30 \text{Mg}^{+2}) - (\text{Cl}^- + \text{S}^{-2})$ mEq/kg MS (Horst *et al.*, 1997).
4. DCAD: $(\text{Na}^+ + \text{K}^+ + 0,38 \text{Ca}^{+2} + 0,30 \text{Mg}^{+2}) - (\text{Cl}^- + 0,60 \text{SO}_4^{2-})$ mEq/kg MS (NRC, 1989).
5. DCAD: $(\text{Na}^+ + \text{K}^+ + 0,15 \text{Ca}^{+2} + 0,15 \text{Mg}^{+2}) - (\text{Cl}^- + 0,25 \text{S}^{-2} + 0,50 \text{P}^{3-})$ mEq/kg MS (Goff, 2000).
6. DCAD: $(\text{Na}^+ + \text{K}^+ + 0,15 \text{Ca}^{+2} + 0,15 \text{Mg}^{+2}) - (\text{Cl}^- + 0,60 \text{S}^{-2} + 0,50 \text{P}^{3-})$ mEq/kg MS (NRC 2001).
7. DCAD: $(\text{Na}^+ + \text{K}^+ + 0,20 \text{Ca}^{+2} + 0,16 \text{Mg}^{+2}) - (\text{Cl}^- + 0,60 \text{S}^{-2} + 0,65 \text{P}^{3-})$ mEq/kg MS (Goff and Horst, 2003b).
8. DCAD: $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - (\text{Cl}^- + 0,60 \text{S}^{-2})$ mEq/kg MS (Goff *et al.*, 2004).

Hasta hace pocos años fue objeto de estudio la forma más apropiada de ecuación para prevenir la hipocalcemia. Así, se realizaron diversas revisiones bibliográficas incluyendo la fórmula más adecuada para predecir la DCAD y el papel que juegan el calcio, fósforo y el magnesio en la patogénesis de la hipocalcemia (Goff, 2000; Oetzel, 2000; McNeill *et al.*, 2002, Thilsing-Hansen *et al.*, 2002b y Lean *et al.*, 2003). Para poder definir que ecuación es la más adecuada se han realizado distintos meta-análisis. El meta-análisis consiste en un

proceso sistemático y riguroso por el que se ponen en conjunto estudios previos sobre una determinada enfermedad y se reanalizan. Los primeros investigadores en utilizar esta herramienta fueron Oetzel (1991) y Enevoldsen (1993). Estos científicos utilizaron modelos de efectos fijos para predecir resultados, aunque ahora está aceptado que esos modelos son vulnerables por la dispersión asociada con el agrupamiento de los efectos en los experimentos y así, para este tipo de análisis se prefieren los modelos de efectos aleatorios (Dohoo *et al.*, 2003).

Unos de los últimos autores en utilizar el meta-análisis fueron Lean *et al.*, en el año 2006, los cuales tomando una base de datos de 137 publicaciones y 2.545 partos, concluyeron que la ecuación número 1 (DCAD: $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - (\text{Cl}^- + \text{S}^{2-})$ mEq/kg MS) es la más adecuada para calcular la DCAD. Por el contrario en otro meta-análisis (Charboneau *et al.*, 2006) determinan que la fórmula más apropiada sería la número 6 (DCAD: $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - (\text{Cl}^- + 0,6 \text{S}^{2-})$ mEq/kg MS) porque esta valdría para valorar el riesgo de sufrir hipocalcemia y también valdría para valorar el pH de la orina. Con todo, este investigador reconoce que la fórmula número 1 es equivalente a la hora de predecir el riesgo de fiebre de la leche.

Por lo tanto, DeGaris y Lean (2008a) sugieren, que basándose en la teoría de los “iones fuertes” y los meta-análisis de Charboneau *et al.* (2006) y Lean *et al.* (2006) la fórmula que debería de ser utilizada para predecir el efecto de la dieta sobre el riesgo de sufrir hipocalcemia sería la número 1 (DCAD: $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - (\text{Cl}^- + \text{S}^{2-})$ mEq/kg MS). Esta ecuación es la actualmente que se emplea con mayor frecuencia en los programas de alimentación del vacuno de leche (Tremblay *et al.*, 2009; FEDNA, 2009).

En general, las raciones en las que predominan los aniones se denominan dietas aniónicas o con DCAD negativa. En el caso de que los cationes sean los más abundantes se habla de dietas catiónicas o con una DCAD positiva. De aquí en adelante, en el texto usaremos indistintamente los dos sinónimos. Como comentaremos más adelante, la prevención de la paresia puerperal hipocalcémica puede conseguirse disminuyendo el pH sanguíneo para evitar la aparición de alcalosis metabólica. La ecuación para el cálculo del DCAD nos indica que dicho pH puede reducirse añadiendo aniones a la dieta o reduciendo la presencia de cationes. Para aumentar la concentración de iones, con carga negativa en la ración, se utilizan las sales aniónicas que aportan fundamentalmente una cantidad extra de cloro y azufre al alimento.

3.2.2.2.1. CARACTERÍSTICAS DE LAS PRINCIPALES SALES ANIÓNICAS.

En la actualidad existen distintos productos comerciales conteniendo un tipo de sal aniónica o la mezcla de varias de ellas. Las más utilizadas se describen en la tabla 1.

Grupo	Sales aniónicas
Cloruros	CaCl ₂ -2H ₂ O
	MgCl ₂ -6H ₂ O
	NH ₄ Cl
Sulfatos	MgSO ₄ -7H ₂ O
	CaSO ₄ -2H ₂ O
	CaSO ₄ D10
	(NH ₄) ₂ SO ₄
Combinaciones	CaCl ₂ -2H ₂ O + MgSO ₄ -7H ₂ O
	NH ₄ Cl + CaSO ₄ -2H ₂ O

Tabla 1: Principales sales aniónicas empleadas en la prevención de la hipocalcemia (Gelfert *et al.*, 2010).

Una de las razones por las que la utilización de estas sales puede no alcanzar los objetivos esperados es el impacto diferente que se consigue dependiendo de la sal utilizada (Gelfert *et al.*, 2009). Así, Goff *et al.* (2004) descubrieron que, las distintas sales aniónicas utilizadas en su investigación, tenían diferente capacidad de alterar el estado ácido-base y propusieron un coeficiente para mejorar la fórmula del DCAD. Usando este coeficiente podríamos tener un DCAD positivo si empleamos sales basadas en sulfatos en vez de cloruros. Pero como demostraron en su investigación, esto sólo podría ocurrir si alimentamos con altas cantidades de estas sales aniónicas. En este mismo estudio se comprobó que bajas dosis de cloruros tenían más impacto sobre el estado ácido-base que las sales de sulfatos.

Ramberg *et al.* (1996) sugirieron que el empleo de sulfato de magnesio no es un acidificante muy efectivo porque conduce a un estado de alcalosis por su déficit en cloro y también porque el efecto laxante del sulfato de magnesio (MgSO₄) podría disminuir la absorción de los aniones. Otra hipótesis que se ha propuesto, es que su poco efecto sobre el estado ácido-base podría ser debido a que las bacterias en el rumen transforman el sulfato en sulfuros y este sería utilizado por las bacterias del rumen para sintetizar proteína microbiana

(Kandylyis y Bray, 1987). Esta suposición explicaría el menor efecto de los sulfatos frente a los cloruros pero no explicaría las diferencias entre el sulfato cálcico (CaSO_4) y el MgSO_4 .

En otros trabajos, no se encontraron diferencias entre el empleo de las distintas sales aniónicas (Oetzel *et al.*, 1991; Vagnoni y Oetzel, 1998), pero, aún así, siempre es recomendable utilizar una combinación de varias para disminuir los posibles efectos tóxicos individuales de cada sal (Oetzel, 1993).

A día de hoy todavía existe debate sobre los diferentes efectos de las sales aniónicas y tampoco está claro el mecanismo por el que actúan, especialmente las sales de sulfatos. Goff (2007) y Roche *et al.* (2002) observaron que los sulfatos podrían prevenir la hipocalcemia sin inducir acidosis metabólica. En los últimos estudios se ha comprobado que las sales de cloruro y las sales de sulfato acidifican la orina en la misma proporción, pero las que tienen un impacto mayor sobre el estado ácido-base son las que emplean cloruros (Goff *et al.*, 2004; Gelfert *et al.*, 2010) y dentro de estas destacaría el CaCl_2 siempre que se minimice la concentración de potasio tanto como sea posible. Si no, como segunda elección, la sal recomendada sería el CaSO_4 (Gelfert *et al.*, 2010).

Una de las fuentes de aniones alternativas a las sales aniónicas son los ácidos inorgánicos. Ender *et al.* (1971) fueron los primeros en utilizar el ácido clorhídrico (HCl) y ácido sulfúrico (H_2SO_4) en las raciones de parto para acidificar la dieta. La mayor limitación de este método es el difícil manejo de estas sustancias en el establo debido a su elevado poder corrosivo, lo que hizo que fueran sustituidos por las sales aniónicas que son mucho más seguras y de administración más sencilla. Goff y Horst (1998) reavivaron el interés por el empleo del HCl como agente acidificante en la alimentación de vacas secas. Para ello, usaron pulpa de remolacha para facilitar la aplicación de este ácido, obteniendo muy buenos resultados en la ingesta de alimento y en la prevención de la hipocalcemia y otras patologías metabólicas en el posparto. Estos autores concluyeron que el ácido clorhídrico es una fuente excelente de anión cloro y un suplemento adecuado para ajustar la DCAD. Sin embargo, en la forma líquida su utilización seguía siendo muy peligrosa para los operarios del establo y, además, muy dañino para la maquinaria. Estos problemas en la actualidad están resueltos, y así son distintas las compañías comerciales que ofrecen este aditivo en forma de suplemento aniónico, de manera que puede administrarse de manera fácil y segura (De Garis y Lean, 2008; Goff, 2008).

3.2.2.2.2. BASES FISIOLÓGICAS PARA LA UTILIZACIÓN DE LAS SALES ANIÓNICAS.

El mecanismo exacto por el cual actúan las sales aniónicas, y son eficaces en la prevención de la fiebre de la leche, es quizás la mayor incógnita a resolver. Tampoco es pretensión de nuestro estudio el descubrirlo, pero sí que el principal objetivo de la memoria de esta tesis doctoral es valorar los cambios en la homeostasis ácido-base y cálcica asociados a la ingesta de las sales aniónicas en el ganado vacuno lechero en nuestras condiciones de trabajo. Ya en 1984, Block planteó la hipótesis de que la DCAD negativa podría provocar una respuesta tan simple como un ligero descenso del pH sanguíneo o tan compleja como una alteración del funcionamiento del hígado y riñón, que consecuentemente afectaría al metabolismo de la vitamina D. Muchos trabajos de investigación se han realizado desde que Block (1984) planteó este problema, pero a día de hoy todavía nadie ha conseguido describir de forma precisa el modo de actuación de estas sales.

Como comentábamos en el apartado anterior, la utilización de este suplemento dietético se basa en la “teoría de iones fuertes de Stewart”. De esta teoría se deduce que la diferencia en el número de equivalentes de aniones y de cationes disponibles en la dieta determina el estado ácido-base del individuo. Los animales que ingieren dietas ricas en aniones tienden hacia la acidosis metabólica, y si consumen raciones donde predominan los cationes desarrollan una ligera alcalosis metabólica (Horst *et al.*, 1997).

A continuación expondremos los distintos factores nutricionales que están implicados en la rotura de la homeostasis cálcica a nivel celular y como consecuencia de esta disfunción dan lugar a la patología hipocalcémica.

3.2.2.2.2.1. FACTORES QUE INTERFIEREN EN LA HOMEOSTASIS CÁLCICA A NIVEL CELULAR.

3.2.2.2.2.1.1. Alcalosis Metabólica.

La homeostasis ácido-base es importante en el metabolismo del calcio, así se ha comprobado que la alcalosis metabólica predispone a las vacas a padecer la fiebre de la leche y la hipocalcemia subclínica (Craigie y Stoll, 1947) y también provoca, en los rumiantes, una disminución en la respuesta a la PTH (Gaynor *et al.*, 1989; Leclerc y Block, 1989; Goff *et al.*, 1991; Phillippo *et al.*, 1994).

En estudios “in vitro” se ha demostrado que la alcalosis metabólica reduce la reabsorción ósea inducida por la PTH (Beck y Webster, 1976; Martin *et al.*, 1980; Bushinsky, 1996). Se

ha podido comprobar (Goff, 2008) que en condiciones normales, con un pH sanguíneo entorno a 7,35 y con niveles adecuados de magnesio, la PTH y su receptor, localizado en la superficie de las células óseas y renales, interactúan como una unión específica “llave-cerradura”. Esta unión estimula a las G-proteínas y a la adenilato ciclasa (complejo adenilato ciclasa) produciendo AMP cíclico, el cual actúa como segundo mensajero dentro del citosol de las células diana, permitiendo que la actividad de esta hormona sea máxima. Sin embargo, cuando aumenta el pH sanguíneo (entorno a 7,45) cambia la conformación estructural del receptor de la PTH y este es menos eficaz para reconocer y unirse a la PTH resultando en un fallo en la activación de la célula para producir AMP cíclico (figura 8).

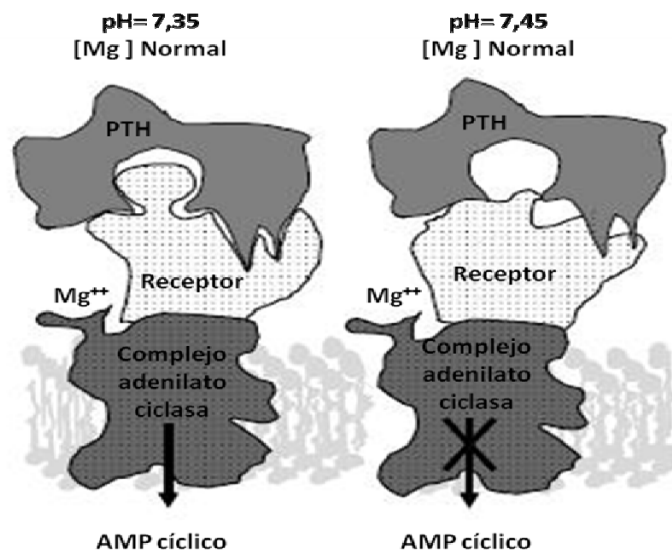


Figura 8: Efecto del pH sanguíneo en la conformación del receptor de la hormona paratiroidea localizado en la membrana plasmática de las células del hueso y del riñón. (Modificado de Goff, 2008).

El fallo en la respuesta del tejido óseo a la PTH produce una disminución de la reabsorción ósea y la osteolisis-osteocítica. A nivel renal provoca una reducción en la reabsorción de calcio por parte de la filtración glomerular y lo que es más importante aún, no se produce la transformación de calcidiol en calcitriol, por lo que la absorción intestinal de calcio también se ve perjudicada (Goff, 2006).

3.2.2.2.1.2. Hipomagnesemia.

La ingestión diaria de magnesio es un factor crítico en el control de la hipocalcemia (Chamberlain y Wilkinson, 2002; Goff, 2004). Cuando se produce una hipomagnesemia el metabolismo del calcio se ve afectado de dos maneras: primero ocurre una disminución en la secreción de PTH aún habiendo una hipocalcemia (Littledike *et al.*, 1983) y, de manera secundaria, se reduce la sensibilidad de los tejidos a la PTH (Rude, 1998).

La correcta interacción entre la PTH y su receptor es totalmente vital para la homeostasis cálcica (figura 9).

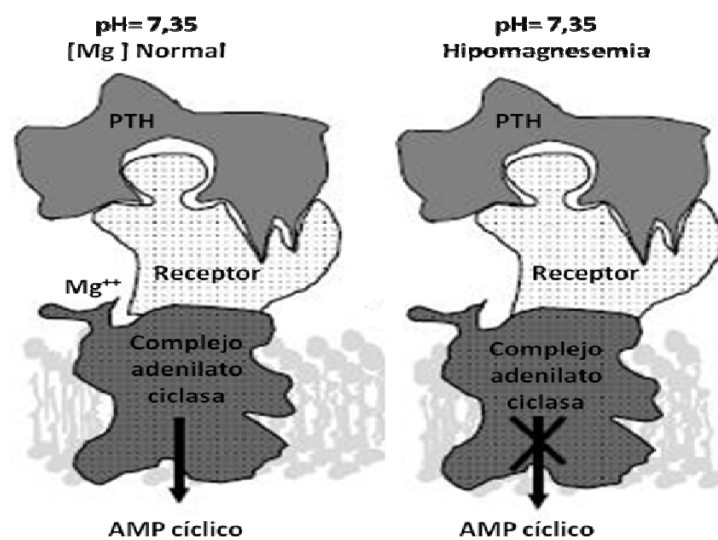


Figura 9: Efecto de la hipomagnesemia en la conformación del receptor de la hormona paratiroidea. (Modificado de Goff, 2008).

La hipomagnesemia, independientemente de la alcalosis metabólica, puede interferir en la capacidad de la PTH para actuar sobre los órganos diana (Sampson *et al.*, 1983; Goff, 2000). Cuando, en condiciones fisiológicas, la PTH se une a su receptor en el hueso o en el riñón provoca la activación de la adenilato-ciclasa y en consecuencia produce el segundo mensajero, el AMP cíclico. En otros tejidos, la unión PTH-receptor podría causar la activación de la fosfolipasa-C, produciendo los segundos mensajeros diacilglicerol y el inositol 1,4,5-trifosfato (Goff, 2008). Tanto la adenilato-ciclasa como la fosfolipasa-C presentan un lugar de unión al ión magnesio para poder ejercer su total actividad (Rude,

1998). En humanos, está completamente reconocido que la hipomagnesemia puede causar hipocalcemia y que la terapia sólo con magnesio restaura la concentración de calcio a valores normales mientras que el tratamiento con calcio y/o vitamina D se muestra ineficaz (Rude, 1998). En el ganado vacuno se ha demostrado que los niveles peripartales de magnesio por debajo de 0,65 mmol/L (1,5 mg/dl) incrementan la susceptibilidad de los animales a padecer hipocalcemia (Contreras *et al.*, 1982; van de Braak *et al.*, 1987).

El mantenimiento de la concentración plasmática de magnesio es totalmente dependiente de la aportación de la dieta. La absorción neta de magnesio se produce en el rumen y en el retículo (Martens y Rayssiguier, 1980) y esta, a su vez, es dependiente de la concentración de magnesio en el rumen y de la integridad del mecanismo de transporte del magnesio (Martens y Gabel, 1986).

La solubilidad de la concentración de magnesio en el rumen puede verse perjudicada por un pH ruminal por encima de 6,5 y por dietas ricas en forrajes (Cook *et al.*, 1994). Los forrajes pueden contener el ácido aconítico y un metabolito de este ácido, el tricarballilato, que forman complejos con el magnesio que el rumen es incapaz de degradar, por lo que esta interacción podría jugar un papel importante en la patología de la tetania hipomagnesémica (Cook *et al.*, 1994).

El transporte activo de magnesio a través de la pared del rumen es necesario cuando el aporte de magnesio en la dieta no es suficiente para cubrir las necesidades del animal. Desafortunadamente, este mecanismo puede verse alterado cuando en el rumen existen altas concentraciones de potasio, ya que este mineral despolariza la membrana apical del rumen y reduce el potencial eléctrico necesario para que el magnesio atraviese su pared (Martens y Schweigel, 2000). Por lo que, aunque la dieta tenga unos niveles adecuados de magnesio su concentración plasmática puede verse disminuida por la interferencia de una alta presencia de potasio en el alimento.

Existe un segundo mecanismo de absorción de magnesio que no se ve afectado por el potasio y es el transporte pasivo. Este mecanismo sólo funciona cuando en el rumen existen altas concentraciones de magnesio, las cuales son absorbidas a través de concentración de gradiente (Martens y Schweigel, 2000). La concentración de magnesio necesaria, en el rumen, para que este proceso tenga lugar es de más de 4 mmol/L (9,72 mg/dl) (Care *et al.*, 1984; Ram *et al.*, 1998).

Como recomendación general se establece una concentración de magnesio en las dietas de secado y de posparto de 3,5 y 4 g/kg para evitar que el transporte pasivo se vea perjudicado (Goff, 2008).

3.2.2.2.1.3. Hiperfosfatemia.

Cuando la concentración de fósforo en el plasma supera el valor fisiológico de 2 mmol/L (6,19 mg/dl), este mineral tiene un efecto directo inhibiendo la enzima renal encargada de transformar el calcidiol en calcitriol (Goff, 1999). Por lo tanto, aunque se produzca una secreción de PTH y esta sea capaz de unirse a los tejidos diana no se estaría produciendo la hormona encargada del transporte intestinal de calcio y la vaca podría padecer hipocalcemia (Julien *et al.*, 1977; Kichura *et al.*, 1982; Barton *et al.*, 1987).

3.2.2.2.3. CAMBIOS PRODUCIDOS POR LAS SALES ANIÓNICAS EN SANGRE, ORINA, INTESTINO, RIÑÓN Y HUESO.

La comparación directa entre los diferentes estudios es compleja, ya que existen diferentes valores de la DCAD y distintos tiempos de administración utilizados por cada autor. Aún así, los cambios provocados por la administración de sales aniónicas en el equilibrio ácido-base en el ganado vacuno lechero los vemos reflejados en los distintos parámetros hemáticos y urinarios.

3.2.2.2.3.1. CAMBIOS EN SANGRE.

Los animales a los que se les alimenta con una DCAD negativa presentan una reducción del pH (tabla 2), pero en pocas investigaciones, la diferencia con respecto a la dieta control o la dieta catiónica llega a ser estadísticamente significativa (Vagnoni y Oetzel, 1998; Schonewille *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2007a; Hersom *et al.*, 2010; Grünberg *et al.*, 2011). Entre los autores que describieron descensos significativos en el pH cuando añadían sales aniónicas, con una DCAD de -168 mEq/kg de MS o -268 mEq/kg de MS, destacan Tucker *et al.*, (1988b). También en esta línea, Roche *et al.*, (2005) observaron un descenso lineal en el pH, en vacas en pastoreo, al disminuir la DCAD de +880 mEq/kg de MS a +230 mEq/kg de MS.

Cabe destacar, con respecto al pH sanguíneo, el meta-análisis de Charbonneau *et al.* (2006), llevado a cabo con 22 publicaciones sobre los efectos de las sales aniónicas en vacas no lactantes, en el que no se encontraron diferencias significativas al analizar los

estudios de manera individual, pero sí que el meta-análisis demostró un efecto negativo y significativo de la baja DCAD sobre el pH. La reducción fue biológicamente pequeña (-0,018 pH unidades, o -0,25%) y resultó en valores de pH dentro de los rangos fisiológicos de 7,27 y 7,50 (Swenson, 1993). Esto no es sorprendente, si tenemos en cuenta que el mantenimiento de la homeostasis ácido-base tiene una prioridad fisiológica mayor que la gestación o lactación (Fauchon *et al.*, 1995). Sin embargo, desde el punto de vista del mantenimiento de la homeostasis cálcica, se ha comprobado que pequeñas disminuciones en el pH sanguíneo tienen una gran influencia en la reabsorción ósea de calcio (Arnett, 2007).

En todos estos trabajos citados anteriormente, los mecanismos homeostáticos fueron capaces de amortiguar la acidosis metabólica originada por la dieta y de mantener el pH sanguíneo dentro del rango fisiológico. La única excepción es el trabajo de Pehrson *et al.* (1986) quienes indujeron una acidosis tan intensa que llegó a provocar la muerte de una vaca, al forzarle a consumir 100 gramos de cloruro amónico dos veces al día.

La casi totalidad de los estudios revisados coinciden en que los animales, que ingerían la dieta con un elevado contenido de cloro y/o azufre, tenían niveles séricos más bajos de bicarbonato y menor reserva alcalina. Uniendo esta observación al hecho de que estos animales mostraban un pH < 7,40 nos lleva a pensar que este hallazgo es indicativo de que el consumo de sales aniónicas provocaba un estado de acidosis metabólica leve.

En lo concerniente a la participación o no de la respiración en la compensación de la acidosis metabólica provocada por las sales aniónicas, existen resultados claramente contradictorios. Por un lado contamos con un conjunto de trabajos en los que la administración de sales aniónicas produce un descenso significativo de los niveles de pCO₂ en sangre (Tucker *et al.*, 1992; Joyce *et al.*, 1997; Gant *et al.*, 1998; Schonewille *et al.*, 1999). Estos estudios apoyan la teoría de que el organismo responde a la existencia de acidosis de origen metabólico con una leve hiperventilación y reducción de los valores de la pCO₂ para intentar que el pH retorne a sus valores normales (Bailey y Pablo, 1998). Por el contrario, en otro grupo de investigaciones, los autores afirmaron que la acidosis metabólica inducida por la dieta es compensada completamente por mecanismos no respiratorios, por lo que no hay diferencias en la concentración de pCO₂ (Ross *et al.*, 1994; Vagnoni y Oetzel, 1998; Roche *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2007b; Charbonneau *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008; Charbonneau *et al.*, 2009; Hersom *et al.*, 2010, Grünberg *et al.*, 2011). La mayor limitación de todos estos trabajos es que exceptuando Ross *et al.* (1994), el resto de los

investigadores utilizaron sangre venosa para valorar el componente respiratorio de la homeostasis ácido-base lo que reduce la exactitud de sus resultados.

Aunque estas hipótesis parezcan contrarias, Charbonneau *et al.* (2006) en su meta-análisis comprobaron que los niveles de pCO₂ en sangre disminuyeron significativamente en -1,9 mmHg (-4,5%), constatando que existe un componente respiratorio en respuesta a la acidosis inducida por la dieta. Los mecanismos respiratorios promueven una más rápida respuesta a la acidosis que los cambios metabólicos (Stewart, 1983). También en otro meta-análisis realizado por Hu *et al.* (2004), con 12 estudios en vacas lactantes, demostraron un efecto significativo de la DCAD en la pCO₂ en sangre.

Por lo que, como hemos visto, aunque en los trabajos individuales no se observa el efecto de la DCAD en la pCO₂ si se ha podido comprobar este efecto en los meta-análisis (Hu *et al.*, 2004; Charbonneau *et al.*, 2006).

3.2.2.2.3.2. CAMBIOS EN ORINA.

Los diferentes trabajos consultados reportan que las variaciones en los parámetros ácido-base urinarios, muestran la respuesta renal típica a un estado de acidosis metabólica (Knepper y Burg, 1988). En esta situación, se incrementa la reabsorción tubular de bicarbonato, aumenta la producción y excreción de amonio, y por tanto es mayor la excreción neta de ácido en orina. En los diversos experimentos con una DCAD negativa se describió una disminución de los niveles de bicarbonato en orina, aumento de la excreción de amonio y acidez titulable (Vagnoni y Oetzel, 1998; Chan *et al.*, 2006; Charbonneau *et al.*, 2008).

La diferencia de iones fuertes ($[[SID^+]]$), definida como la suma de cationes fuertes (Ej: sodio y potasio) menos la suma de aniones fuertes (Ej: cloro y azufre), ha sido propuesta como una de las principales variables independientes que determinan el balance ácido-base de todos los fluidos biológicos (Stewart, 1983). Dada la elevada ingesta de aniones con las dietas con DCAD negativa, y para mantener la homeostasis ácido-base sanguínea, el riñón debe eliminar este exceso de aniones lo que se manifiesta mediante un descenso de la diferencia de iones fuertes en orina (Vagnoni y Oetzel, 1998).

AUTOR	FÓRMULA DCAD	DCAD (mEq/kg MS)	pH SANGRE	pH ORINA	pCO ₂ (mmHg)
Apper-Bossard <i>et al.</i> , 2006	(1)	+390	7,48		40,0
		+238	7,47		39,9
		+87	7,47		39,3
Kurosaki <i>et al.</i> , 2007	(1)	+153 ^(a)		7,00	
		+153		7,40	
		+146		8,00	
		+12		6,80	
Liesegang <i>et al.</i> , 2007	(6)	+210		8,50	
		+181		8,50	
		+28		8,50	
		-48		6,85	
Roche <i>et al.</i> , 2007	(*)	+180		8,50	
		-200		5,70	
Hu <i>et al.</i> , 2007b	(1)	+470	7,38	8,23	47,2
		+220	7,37	7,94	49,1
		-30	7,37	7,04	45,7
Gelfert <i>et al.</i> , 2007	(1)	+239	7,37	7,59	
		+139	7,36	7,33	
		+89	7,35	6,89	
		+55	7,37	7,13	
		-155	7,32	6,02	
Charbonneau <i>et al.</i> , 2008	(1)	+296	7,40	8,21	42,9
		-24 ^(b)	7,37	5,89	41,5
		-19 ^(c)	7,31	5,78	40,9
Li <i>et al.</i> , 2008	(4)	+224	7,95	8,60	
		+151	7,63	7,41	
		-265	7,35	6,21	

Tabla 2: Cambios en el pH sanguíneo y urinario y pCO₂ en función de diferentes DCAD. (a) novillas. (b) forrajes bajos en potasio. (c) alimentos acidificados, no sales aniónicas. (1) DCAD: (Na⁺ + K⁺) - (Cl⁻ + S⁻²) mEq/kg MS (Ender *et al.*, 1962; Block, 1984). (4) DCAD: (Na⁺ + K⁺ + 0,38 Ca⁺² + 0,30 Mg⁺²) - (Cl⁻ + 0,60 SO₄⁻²) mEq/kg MS (NRC, 1989). (6) DCAD: (Na⁺ + K⁺ + 0,15 Ca⁺² + 0,15 Mg⁺²) - (Cl⁻ + 0,60 S⁻² + 0,50 P⁻³) mEq/kg MS (NRC 2001). (*) DCAD (mEq/100 g MS): (Na⁺/0,023)+(K⁺/0,039)-(Cl⁻/0,0355)-(S⁻²/0,016).

AUTOR	FÓRMULA DCAD	DCAD (mEq/kg MS)	pH SANGRE	pH ORINA	pCO ₂ (mmHg)
Wu <i>et al.</i> , 2008	(1)	+127	7,41	7,67	
		+30	7,40	6,90	
		-63	7,39	6,30	
		-154	7,36	5,75	
Charbonneau <i>et al.</i> , 2009	(1)	+232	7,42	8,18	43,0
		-21 ^(b)	7,37	6,15	44,0
		-32	7,33	5,98	43,0
Heron <i>et al.</i> , 2009	(1)	+251 ^(b)	7,47	7,83	40,2
		+141 ^(b)	7,44	7,15	39,0
		+41 ^(b)	7,44	6,88	39,9
Ramos-Nieves <i>et al.</i> , 2009	(1)	+110		8,20	
		-150		6,70	
Rérat <i>et al.</i> , 2009	(1)	+514 ^(b)	7,39	8,36	
		+195 ^(b)	7,38	8,23	
Degroot <i>et al.</i> , 2010	(1)	+221		8,03	
		-98		6,66	
		-113 ^(c)		6,52	
		-121 ^(c)		5,93	
Seifi <i>et al.</i> , 2010	(1)	+192	7,34	8,40	
		-82	7,33	6,20	
Grünberg <i>et al.</i> , 2011	(1)	+150	7,36	8,00	43,05
		-130	7,36	7,20	41,56

Tabla 2 (continuación): Cambios en el pH sanguíneo y urinario y pCO₂ en función de diferentes DCAD. (a) novillas. (b) forrajes bajos en potasio. (c) alimentos acidificados, no sales aniónicas. (1) DCAD: $(Na^+ + K^+) - (Cl^- + S^{2-})$ mEq/kg MS (Ender *et al.*, 1962; Block, 1984). (4) DCAD: $(Na^+ + K^+ + 0,38 Ca^{+2} + 0,30 Mg^{+2}) - (Cl^- + 0,60SO_4^{2-})$ mEq/kg MS (NRC, 1989). (6) DCAD: $(Na^+ + K^+ + 0,15 Ca^{+2} + 0,15 Mg^{+2}) - (Cl^- + 0,60 S^{2-} + 0,50 P^{3-})$ mEq/kg MS (NRC 2001). (*) DCAD (mEq/100 g MS): $(Na^+/0,023)+(K^+/0,039)-(Cl^-/0,0355)-(S^{2-}/0,016)$.

La aportación más interesante de estas investigaciones, en las que se valoran los efectos de las sales aniónicas en la orina, es la existencia de una fuerte correlación entre el pH urinario y la excreción neta de ácido ($r^2= 0,95$; $p<0,001$) en los animales que recibían este suplemento dietético (Vagnoni y Oetzel, 1998). Posteriormente, Spanghero (2004), Charbonneau *et al.* (2006) y Wu *et al.* (2008) también encontraron una correlación positiva ($r^2= 0,81$, $p<0,01$; $r^2= 0,78$, $p<0,01$; $r^2= 0,85$, $p<0,0001$; respectivamente) entre la DCAD y el pH urinario. Estos resultados sugieren que la determinación del pH urinario podría ser una herramienta útil, práctica y fácil de utilizar a nivel de granja para valorar el grado de acidosis metabólica inducida por la DCAD negativa (Vagnoni y Oetzel, 1998; Charbonneau *et al.*,

2006); ya que como hemos visto, las variaciones en el pH sanguíneo son mucho menores debido a los fuertes mecanismos homeostáticos que las que se producen en el pH de la orina (Spanghero, 2004). También se ha demostrado que existe una relación entre el pH de la sangre y el pH urinario, ya que aumentan de manera lineal o cuadrática al incrementarse la DCAD (Tucker *et al.*, 1988a).

Los rumiantes poseen unas enormes reservas de bases (Atkinson y Camien, 1982). El pH de la orina de los bovinos, como el del resto de los herbívoros, es mayor de 8, y el pH urinario de las vacas lecheras alimentadas con dietas catiónicas está por encima de 8,2 (Oetzel, 2002). Sin embargo, el pH urinario óptimo para la prevención de la fiebre de la leche en vacas de raza Frisona ha sido establecido por la mayoría de los investigadores entre 6 y 7 (Block, 1984; Oetzel *et al.*, 1991; Wang y Beede, 1992a; Phillippo y Reid, 1994; Jardon, 1995; Goff y Horst, 1998; Goff, 2004, 2008) y para las vacas de raza Jersey entre 5,8 y 6,3 (Jardon, 1995; Goff, 2008).

Por el contrario, Charbonneau *et al.* (2006) recomiendan que el pH urinario óptimo no debería bajar de 7 porque el riesgo de trabajar con un pH menor nos conduciría al problema de una excesiva acidificación, y sólo obtendríamos un modesto beneficio en la prevención de la hipocalcemia (alrededor de 2,8 unidades de porcentaje) con respecto a reducir el pH sólo hasta 7. También, Ramos-Nieves *et al.* (2009) sugieren que diferencias de 1,5 unidades en el pH urinario del parto no resultan necesariamente en grandes diferencias en el nivel de calcio peripartal. Tucker *et al.* (1992) y Kurosaki *et al.* (2007) utilizando sales aniónicas y dietas con una baja DCAD disminuyeron el pH urinario hasta el rango 6-7 y no consiguieron mejoras en el nivel de calcio iónico ni en la prevención de la hipocalcemia. Similarmente Goff y Horst (1997) encontraron en su investigación que uno de los grupos que estaban tratando con una DCAD alta y con un pH en la orina claramente alcalino (8,23) presentaba una elevada concentración de calcio iónico a las 12 horas posparto en comparación con los grupos que tenían un pH bajo.

Estos hallazgos concuerdan con lo aportado por Charbonneau *et al.* (2006), los cuales sugieren que las dietas DCAD están más correlacionadas con el pH urinario que con la incidencia de hipocalcemia. Seifi *et al.* (2004) analizaron la utilización del pH urinario durante el periodo del parto (48 horas antes de la fecha de parto) como una herramienta predictiva para identificar los animales en riesgo de desarrollar una hipocalcemia clínica durante el posparto. Encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) entre el pH urinario de las vacas tumbadas por hipocalcemia de las vacas no tumbadas. Así,

sugieren que las vacas con un pH superior a 8,25 tienen más probabilidades de desarrollar una hipocalcemia clínica.

En el caso de que el pH de la orina este por debajo 5,5 indicaría que existe un exceso de aniones. Por lo que los animales podrían sufrir una acidosis metabólica que el organismo no sería capaz de compensar y también sufrirían una caída en la ingestión de materia seca (Braithwaite, 1972; Jardon, 1995; Horst *et al.*, 1997). Este riesgo es mucho más elevado en condiciones prácticas porque en una granja comercial existen variaciones diarias en el balance mineral de los forrajes y también, en la alimentación ordinaria se pueden producir variaciones subclínicas en el equilibrio ácido-base (Freedden *et al.*, 1998b).

3.2.2.3.3. INTESTINO.

La mayoría de los trabajos revisados muestran resultados indicativos de que los animales alimentados con sales aniónicas tienen una mayor absorción de calcio desde el tracto gastrointestinal (Goff y Horst, 2003b; Lean *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2008). A pesar de que Block (1984) había planteado una teoría diferente, según la cual las dietas con sales aniónicas actuarían en el sistema digestivo como si fuesen dietas con un contenido bajo de calcio, no hay datos en su investigación ni experimentos posteriores que pudiesen probar una reducción en la captación de calcio en el intestino con dietas con una DCAD negativa.

El aspecto que ofrece una mayor discrepancia es saber si una dieta rica en aniones puede mejorar la absorción activa o pasiva de calcio. En los primeros experimentos, se sugirió que la dieta acidificante intensificaba la absorción pasiva de calcio en el tracto digestivo cuando existía un balance positivo de este mineral. Varios artículos sugirieron la posibilidad de que los ácidos de la dieta disminuirían el pH en el tubo digestivo, lo que favorecería la disolución de calcio y facilitaría su absorción (Dishington, 1975; Lomba *et al.*, 1978).

Como vimos anteriormente, la absorción activa de calcio a través del intestino está regulada por el calcitriol y la absorción pasiva es concentración-dependiente. En este sentido, Karabach (1992) demostró que entre el 60-70% de la absorción a través de la mucosa-serosa del intestino es pasiva y el 30-40% restante es activa. Kurosaki *et al.* (2007) observaron que el aumento de calcio plasmático e iónico en el momento del parto, en los animales que recibieron sales aniónicas y un suplemento de calcio, no podía ser debido sólo a la absorción intestinal, porque los animales que sólo recibieron el suplemento de calcio, el nivel de calcio plasmático e iónico fue más bajo que en el grupo de sales aniónicas, y en cambio tenían los mismos niveles de calcitriol en ambos grupos.

También, para Takagi y Block (1991) y Liesegang *et al.* (2007) la absorción activa de calcio en el intestino tenía poca importancia, puesto que las dietas que empleaban en su trabajo poseían unos niveles altos de este mineral, y con estos porcentajes la absorción activa estaba deprimida. Joyce *et al.* (1997) ya habían observado que los animales alimentados con la dieta catiónica poseían valores más elevados de calcitriol que los que recibían la dieta aniónica, lo que parecía indicar que uno de los principales mecanismos de captación activa estaría deprimido en las vacas que recibían las sales aniónicas. Sin embargo, otro grupo de investigadores discreparon de estos resultados, y determinaron mayores niveles de vitamina D en las vacas que reciben dietas aniónicas, lo que justificaría que la absorción activa en el intestino estuviese incrementada (Abu Damir *et al.*, 1994; Phillippo *et al.*, 1994).

Finalmente, debemos comentar que Goff *et al.* (1995) añadieron mayor incertidumbre a estos trabajos, al detectar un aumento de los receptores para la vitamina D (VDR) en las vacas alimentadas con una ración con DCAD negativa, lo que implicaba que esos individuos podían tener una mayor respuesta a la vitamina D aunque presentasen concentraciones más bajas de esta hormona.

Por lo tanto, a modo de resumen, podemos indicar que la mayoría de trabajos consiguieron probar que los animales alimentados con una dieta con una DCAD negativa tienen una mayor absorción de calcio en el intestino; no obstante, no se conoce con precisión el mecanismo responsable de este incremento.

3.2.2.2.3.4. RIÑÓN.

En el riñón, el efecto acidogénico de las sales aniónicas genera una respuesta defensiva por parte del organismo. Las principales consecuencias de esta manifestación las observamos en un incremento de la excreción urinaria de calcio y posiblemente en un incremento de la sensibilidad de la 1- α -hidroxilasa renal a la acción de la PTH (Goff *et al.*, 1991; Van Dijk y Lourens, 2001).

En relación a la hipercalciuria, ha sido demostrado que estados de acidosis metabólica incrementan la excreción de calcio en la orina en numerosas especies (DeGaris y Lean, 2008a). Así, en las ovejas y en las cabras se observa un aumento de la calciuria (Liesegang, 2008), y en las vacas, independientemente de su estado de lactación, también se ha observado ampliamente este efecto en los distintos trabajos consultados (Freeden *et al.*, 1988b; Van Mosel *et al.*, 1993; Beender *et al.*, 2003; Wildman *et al.*, 2007). Tres son los posibles mecanismos fisiológicos responsables de la aparición de la hipercaluria:

- i. **Respuesta a la acidosis inducida por las sales aniónicas:** el riñón es un órgano fundamental en la regulación de la homeostasis ácido-base de los animales. En una situación de acidosis metabólica, la respuesta a nivel renal consiste en un incremento en la reabsorción del ión bicarbonato. Dado que la reabsorción tubular renal de calcio está correlacionada de forma negativa con la de bicarbonato, el aumento de la reabsorción de este anión se acompaña de una mayor pérdida de calcio (Oetzel *et al.*, 1988).

Además, Sutton *et al.* (1979) demostraron la existencia de un componente tubular de reabsorción activa de calcio situado en el túbulo contorneado proximal y que está controlado por el estado ácido-base del organismo, de forma que su actividad se inhibía en individuos con acidosis metabólica crónica y se activaba en condiciones de alcalosis. También, Van Mosel *et al.* (1994) demostraron que las vacas que recibían una alimentación basada en sales aniónicas sufrían un descenso en la reabsorción tubular renal de calcio.

- ii. **Interacción con el azufre de la dieta:** todas las sales aniónicas producen un aumento en la eliminación urinaria de calcio, pero las sales de azufre son las que originan la hipercalcemia de mayor entidad (Oetzel *et al.*, 1991). Esto es debido a que el anión sulfato es objeto de una reabsorción renal limitada y forma complejos insolubles con el calcio presente en el filtrado glomerular, lo que acrecienta la excreción urinaria de calcio en forma de sulfato cálcico (Quamme, 1981; Whiting y Draper, 1981). Otros trabajos sugieren que tanto las sales de cloro como las de azufre interfieren con el calcio resultando en hipercalcemia (Whiting y Draper, 1981; Whiting *et al.*; 1986). Por el contrario, Gelfert *et al.* (2010) observaron que las sales aniónicas que más hipercalcemia provocan son las de CaCl_2 .

- iii. **Mayor disponibilidad de calcio.** Distintos investigadores sugieren que la hipercalcemia presente en el parto de las vacas alimentadas con sales aniónicas es el resultado del incremento del flujo de calcio desde fuentes intercambiables de calcio tales como el hueso (Block, 1984; Horst *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1992b). Tucker *et al.* (1992) atribuyeron la mayor excreción de calcio a un aumento de la disponibilidad de este mineral debido a un incremento de absorción intestinal y reabsorción ósea, y señalaron que la determinación de la cantidad de calcio en orina podría ser útil para evaluar el estatus del calcio de un

individuo. Schonewille *et al.* (1999) afirmaron que las sales aniónicas producían un incremento en la movilización de calcio en el organismo, y esto se veía reflejado en una mayor excreción urinaria de este mineral. Además, en momentos de estrés cálcico (como el inicio de la lactación), el calcio del filtrado glomerular se reabsorbía por completo y podía ser utilizado para las diferentes funciones metabólicas.

Como veremos más adelante, las recomendaciones sobre el empleo de sales aniónicas en la dieta de las vacas lecheras sugieren que se deben administrar en combinación con una alta concentración de calcio (Wilde, 2006). Aún utilizando una concentración de calcio en la dieta muy superior a la sugerida por el NRC (2001), no se observa un aumento en la excreción de calcio por parte de los riñones durante el parto (Gelfert y Staufenbiel, 2008).

Otro de los efectos beneficiosos de una dieta con una diferencia catiónica-aniónica negativa, a nivel renal, es el aumento de la sensibilidad de la 1- α -hidroxilasa renal a la acción de la PTH. Entre los investigadores que defienden esta teoría nos encontramos Abu Damir *et al.* (1994) y Phillippo *et al.* (1994), quienes detectaron una subida de los niveles de calcitriol en vacas alimentadas con dieta ácida sin una elevación previa de los niveles de PTH y sin que hubiese diferencias en la concentración de calcio, fósforo, magnesio y calcidiol. Goff y Horst (1997) también determinaron una menor concentración de calcitriol en animales alimentados con una DCAD positiva, a pesar de que tenían concentraciones de PTH más elevadas que los de la dieta aniónica. Este hecho concordaba con la hipótesis de que la alcalosis metabólica, inducida por la dieta catiónica, hacía que órganos como el riñón fuesen temporalmente refractarios a la acción de hormonas como la PTH.

Por último, Li *et al.* (2008) observaron un aumento en los niveles plasmáticos de aldosterona. Esta hormona facilita a nivel renal la reabsorción de sodio. Como la secreción de los iones hidrógeno se acompaña de la reabsorción de sodio, el incremento a nivel plasmático de aldosterona en combinación con una DCAD baja en la dieta podría incrementar la secreción de iones de hidrógeno por parte del riñón.

3.2.2.2.5.5. HUESO.

En la mayoría de los trabajos publicados se señala que las sales aniónicas inducen un incremento de la movilización de calcio óseo. El hueso es el principal almacén de calcio, y Schonewille *et al.* (1999) trabajando con vacas, a las que inducían hipocalcemia mediante la

administración de EDTA-Na₂, observaron que más del 50 % del calcio, al que recurría el organismo para defenderse de la disminución repentina de los niveles de este mineral, provenía del hueso. Este hallazgo también ha sido citado en un estudio similar, en el también que se inducía hipocalcemia mediante la administración de EDTA-Na₂, llevado a cabo por Heron *et al.* (2009).

La mayor disponibilidad de calcio óseo provocada por las sales aniónicas tiene dos posibles orígenes:

- i. **Respuesta del hueso a la acidosis metabólica:** Beck y Webster (1976) investigaron el efecto de la acidosis en las ratas y, para ello, eliminaron quirúrgicamente las glándulas tiroideas y paratiroides, el intestino y el riñón. En este trabajo, observaron que las concentraciones serológicas de calcio sérico e iónico fueron mayores en las ratas que sufrían acidosis que en aquellas que no la sufrieron. Por lo que con este estudio demostraron que estados de acidosis metabólica pueden causar altas concentraciones de calcio sérico e iónico debido a la movilización directa del calcio óseo.

El tejido óseo actúa como un reservorio importante de bases para controlar el equilibrio ácido-base de los fluidos corporales (Goff, 2000). Cuando los animales reciben una dieta acidificante, el hueso responde con la liberación de cationes (principalmente calcio, sodio y potasio) para intentar mantener el pH sanguíneo dentro del rango fisiológico (Goff y Horst, 1998). Dentro de este grupo cabe destacar la observación realizada por Espino *et al.*, (2003), los cuales variando la DCAD de la ración en ovejas no encontraron diferencias estadísticamente significativas en los marcadores que miden la reabsorción ósea. Además, hallaron que, en torno al momento al parto, los animales presentaban mayores concentraciones de osteocalcina cuando eran alimentados con dietas de menor DCAD, manifestándose en contra de la teoría de que la acidosis metabólica reduce la neoformación ósea y apoyando las afirmaciones Goff *et al.*, (1991) de que en vacas alimentadas con dietas aniónicas en torno al parto se produce una mejor utilización del calcio óseo.

- ii. **Incremento de la reabsorción ósea mediada por células.** El efecto de estas sales, en la funcionalidad de las células óseas, se hace evidente básicamente en tres situaciones: después de un período de adaptación largo, en animales

jóvenes en crecimiento rápido (Whiting y Draper, 1981) o durante períodos de aumento de la demanda de calcio (tales como la lactación o la parte final de la gestación) (Block, 1984; Leclerc y Block, 1989). Una dieta acidificada con sulfato y cloruro amónico, o ambos, aumentaba el número y actividad de las células responsables de la remodelación del hueso en ratas (Horts y Jorgensen, 1974).

En la bibliografía consultada pocos estudios han utilizado marcadores específicos para medir los parámetros óseos. Abu Damir *et al.* (1994) realizaron exámenes histológicos de costillas y observaron un incremento de tejido temporal que podría actuar como una reserva de calcio fácilmente disponible. Esto podría sugerir la idea de que las sales aniónicas administradas en la dieta producen un aumento de la reabsorción ósea. Otros estudios (Block, 1984; Goff *et al.*, 1991) midieron hidroxiprolina, la cual no es un marcador específico de la reabsorción ósea, y encontraron valores aumentados de este parámetro. Así, concluyen que, una dieta baja en calcio a la cual se le añaden sales aniónicas induce un aumento en la excreción de calcio por la vía urinaria y un descenso en el pH urinario, por lo que esta combinación podría jugar un papel muy importante en la prevención de la hipocalcemia. Esta observación también es citada por Schonewille *et al.* (1994). Espino (2003), en su estudio realizado en ovejas a las que se les realizó biopsias óseas de la tibia, describe cambios en la estructura del hueso compatibles con un aumento de la reabsorción ósea en ovejas alimentadas con sales aniónicas. Por el contrario, Liesegang *et al.* (2007) observaron que las dietas que contenían sales aniónicas y diferentes niveles de calcio no tenían diferencias significativas en cuanto a la formación y reabsorción ósea. Quizás porque la DCAD de este experimento no fue lo suficientemente baja para inducir acidosis metabólica.

También, Liesegang (2008), en estudio realizado con cabras y ovejas observa que el marcador específico de la reabsorción ósea, el telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo I, muestra diferencias significativas entre las cabras que se suplementan con sales aniónicas y el grupo control, pero no en las ovejas. En cambio el marcador de formación ósea, la osteocalcina, fue más baja durante el parto de las dos especies.

3.2.2.2.4. SALES ANIÓNICAS Y MINERALES SÉRICOS.

En las tablas 3 y 4, se recogen los resultados publicados en los trabajos que consideramos más relevantes sobre la utilización de sales aniónicas en vacas y los efectos de la administración de estas dietas en los principales minerales sanguíneos. Otra vez más, es importante destacar la ausencia de uniformidad en los datos aportados por los diversos investigadores ya que existen diferentes valores de la DCAD y distintos tiempos de administración utilizados por cada autor. De forma breve, abordaremos los cambios originados por las sales aniónicas en diferentes minerales considerándolos en dos grandes grupos:

- 1) Calcio, fósforo y magnesio.
- 2) Sodio, potasio y cloro.

3.2.2.2.4.1. CALCIO, FÓSFORO Y MAGNESIO.

Respecto a los niveles de calcio total en sangre, hay que resaltar que no aparecen diferencias significativas entre las dietas con una DCAD positiva o negativa cuando estas se utilizan en animales no gestantes (Gelfert *et al.*, 2007), o en animales lactantes (Hu *et al.*, 2007b). Cuando esta alimentación se aplica en momentos de gran demanda, como puede ser el parto e inicio de la lactación, existen discrepancias ya que hay investigadores que observan un aumento significativo de la calcemia en los animales que ingieren sales aniónicas (Leclerc y Block, 1989; Goff *et al.*, 1991; Joyce *et al.*, 1997; Roche *et al.*, 2003; Charbonneau *et al.*, 2006; Kurosaki *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2008; Seifi *et al.*, 2010) y por el contrario (Vagnoni y Oetzel, 1998; Gasperlin *et al.*, 2002; Chan *et al.* 2006; Gelfert *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008; Ramos-Nieves *et al.*, 2009; DeGroot *et al.*, 2010) no detectan significación estadística.

Así, en el estudio de Chan *et al.* (2006), a pesar de aplicar dos tipos de dieta con distintos niveles de calcio no encuentran diferencias significativas en los niveles de calcio en sangre. Tampoco Ramos-Nieves *et al.*, (2009) obtienen diferencias significativas, y creen que es debido a que en muchos de los trabajos previos se utilizaron vacas con alto riesgo de hipocalcemia, vacas multíparas y de raza Jersey, y con animales control con una DCAD mucho mayor que la empleada por ellos. Por el contrario, aunque DeGroot *et al.*, (2010) no

obtienen diferencias significativas en el promedio de la concentración plasmática de calcio en el parto, justifican este hecho en un inadecuado tamaño de muestra para evaluar la alta variabilidad estadística del calcio plasmático.

Cuando valoramos el efecto de las sales aniónicas en la concentración de calcio iónico, existe una opinión generalizada de que las dietas con una DCAD negativa incrementan los niveles séricos de la fracción de calcio biológicamente activa (Wang y Beede, 1992b; Joyce *et al.*, 1997; Schonewille *et al.*, 1999; Kurosaki *et al.*, 2007). Charbonneau *et al.*, (2006) y Lean *et al.*, (2006) demostraron, en ambos meta-análisis llevados a cabo por estos investigadores, que una alimentación en el parto con una dieta con una baja DCAD produce un aumento en el calcio plasmático estadísticamente significativo.

El estado de acidosis metabólica subclínica, en el que se encuentran los animales alimentados con un nivel elevado de aniones, puede aportarnos la justificación fisiológica al ascenso de la concentración sérica de calcio iónico. En esta situación existe una competición entre los iones de hidrógeno y el calcio por los puntos de unión a las proteínas plasmáticas, por ello cuando se eleva la tasa de protones se favorece la disociación de la unión del calcio a proteínas, con el correspondiente aumento de los niveles de la fracción iónica de este mineral. Moore (1970) examinó el efecto del pH en la concentración de calcio ionizado, en un rango de pH de 6,8 a 7,8, en sangre humana "in vitro", demostrando la existencia de cambios instantáneos y reversibles en función del pH, observando un incremento lineal o de forma sigmoide en la concentración de calcio iónico al disminuir el pH sanguíneo.

Por el contrario, Gelfert y Staufenbiel (2008) concluyen que independientemente del nivel de calcio en la dieta, no ocurren cambios significativos en las concentraciones de calcio iónico. Este hecho no es sorprendente debido al fuerte control hormonal que regula el metabolismo del calcio (Hartmann y Brand, 2000) y que rápidamente corrige cualquier cambio en los niveles séricos del calcio iónico.

AUTOR	FÓRMULA DCAD	DCAD (meq/kg MS)	Calcio total (mg/dl)	Calcio iónico (mg/dl)	Fósforo (mg/dl)	Magnesio (mg/dl)
Roche <i>et al.</i> , 2003	(1)	+50	8,71			1,37
		+7	8,28			1,32
Chan <i>et al.</i> , 2006	(1)	-60,00 ^(a)	9,34		5,59	
		-60,00	8,93		5,47	
		-50,57 ^(b)	8,32		5,99	
		-60,02 ^(c)	8,49		4,61	
Gelfert <i>et al.</i> , 2007	(1)	+239	9,14	4,05		
		+139	9,66	4,01		
		+89	9,26	4,21		
		+55	9,14	4,01		
		-155	9,06	4,45		
Kurosaki <i>et al.</i> , 2007	(1)	+153 ^(a)	8,30	4,77		
		+153	6,20	4,81		
		+146	6,50	4,81		
		+12	7,30	5,09		
Liesegang <i>et al.</i> , 2007	(6)	+210	7,41			
		+181	7,49			
		+28	8,02			
		-48	7,62			
Roche <i>et al.</i> , 2007	(*)	+18	10,02			
		-20	9,82			
Li <i>et al.</i> , 2008	(4)	+224	9,54		5,92	2,02
		+151	9,66		6,01	2,19
		-265	8,74		5,61	2,36
Wu <i>et al.</i> , 2008	(1)	+127	8,55		5,22	2,05
		+30	8,65		5,22	2,07
		-63	8,85		4,97	2,10
		-154	9,02		5,14	2,19
Charbonneau <i>et al.</i> , 2009	(1)	+232		5,21		
		-21 ^(d)		5,30		
		-32		5,41		
Ramos-Nieves <i>et al.</i> , 2009	(1)	+110	8,42		4,88	1,51
		-150	8,50		5,26	1,48
Seifi <i>et al.</i> , 2010	(1)	+192	9,13		6,03	2,01
		-82	10,26		6,62	1,96

Tabla 3: Efectos de la administración de sales aniónicas en rumiantes en el calcio, fósforo y magnesio. (a) novillas. (b) 1,50% Ca. (c) 0,99% Ca. (d) forrajes bajos en potasio. (1). DCAD: $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - (\text{Cl}^- + \text{S}^{2-})$ mEq/kg MS (Ender *et al.*, 1962; Block, 1984). (4) DCAD: $(\text{Na}^+ + \text{K}^+ + 0,38 \text{Ca}^{+2} + 0,30 \text{Mg}^{+2}) - (\text{Cl}^- + 0,60 \text{SO}_4^{2-})$ mEq/kg MS (NRC, 1989). (6) DCAD: $(\text{Na}^+ + \text{K}^+ + 0,15 \text{Ca}^{+2} + 0,15 \text{Mg}^{+2}) - (\text{Cl}^- + 0,60 \text{S}^{2-} + 0,50 \text{P}^{3-})$ mEq/kg MS (NRC 2001). (*) DCAD (mEq/100 g MS): $(\text{Na}^+/0,023) + (\text{K}^+/0,039) - (\text{Cl}^-/0,0355) - (\text{S}^{2-}/0,016)$.

En relación a las variaciones en los niveles de fósforo en sangre, los resultados publicados todavía son más inconsistentes. Suponiendo que la disolución de los cristales de hidroxiapatita (fosfato tricálcico) sean la fuente de calcio extra de la que disponen los individuos que reciben una dieta aniónica, lo lógico sería encontrar en estos animales un incremento de los niveles séricos no sólo de calcio sino también de fósforo (Joyce *et al.*, 1997). De acuerdo con esta observación, Chan *et al.* (2006) describieron una fosfatemia más alta en los individuos que ingerían la dieta aniónica. También Borucki Castro *et al.* (2004) observaron unos niveles más altos de fósforo en el plasma, lo cual lo asociaron a una mayor cantidad de fósforo en la saliva (Valk *et al.*, 2002). Sin embargo, en la mayoría de los trabajos no hay diferencias significativas en la concentración de fósforo sérico entre los diferentes tipos de dieta (Li *et al.*, 2008; Seifi *et al.*, 2010, Grünberg *et al.*, 2011).

Referente al magnesio, no se han destacado diferencias significativas entre las dietas, aunque la concentración de este mineral tiende a ser mayor en los animales alimentados con una DCAD negativa. Poe *et al.* (1985) aportaron una razón fisiológica a este hecho, puesto que comprobaron que en ovejas el consumo de una cantidad elevada de sodio (como sucede en los individuos que reciben la dieta catiónica) disminuía la absorción y retención de magnesio. Li *et al.* (2008) observaron un aumento significativo en los niveles de magnesio plasmáticos, aunque creen que pudo ser debido a que utilizaron cloruro de magnesio como acidificante de la ración. En esta misma dirección se encuentran los resultados de Wu *et al.* (2008) que consideran la mayor ingesta de magnesio en las dietas ricas en aniones como posible causa de la elevación de los niveles séricos de este mineral.

3.2.2.2.4.2. SODIO, POTASIO Y CLORO.

En general, las concentraciones de sodio, potasio y cloro en suero suelen reflejar las diferencias en la ingesta de estos minerales en la dieta (Delaquis y Block, 1995a y 1995b). La natremia tiende a ser mayor a medida que la DCAD se hace más positiva; sin embargo, siempre se mantiene dentro del rango fisiológico y sin diferencias estadísticamente significativas (Delaquis y Block, 1995a y 1995b). El sodio permanece en niveles estables en el fluido extracelular, debido a un incremento en su excreción renal para mantener las funciones vitales para las que se necesita este mineral (Fauchon *et al.*, 1995).

Referente a los cambios en la natremia, asociados con la ingesta de sales aniónicas, podríamos resaltar el trabajo de Block (1984), quien destacó que las vacas que recibían la dieta catiónica tenían una mayor concentración de sodio y, dentro de este grupo, los

animales que padecían paresia puerperal tenían mayores niveles que los individuos sanos. Wildman *et al.* (2007) comprobaron que los altos valores en la excreción fraccionada y los altos valores de sodio sanguíneos podrían ser debidos a que las dietas con una alta DCAD contendrían altos niveles de este mineral. Otra idea alternativa para explicar el incremento en la absorción de sodio es la aportada por Greene *et al.* (1983a), quienes proponen que una elevada concentración de potasio en la dieta podría tener como consecuencia un aumento en la absorción y excreción de sodio.

En las raciones con una DCAD positiva, la ingesta de potasio es mayor que en las dietas aniónicas, por lo tanto, es esperable que los animales que ingieren una ración catiónica presenten niveles plasmáticos más elevados de este mineral. Sin embargo, esta suposición no se ve reflejada en diversos experimentos y en un número importante de artículos. Así, en algunos estudios los individuos alimentados con dietas aniónicas tienen concentraciones levemente superiores de potasio en sangre (Block, 1984; Vagnoni y Oetzel, 1998; Schonewille *et al.*, 1999). Este hecho, aparentemente contradictorio, podría ser explicado por el papel de defensa de los cationes óseos frente a la acidosis metabólica. El potasio se liberaría desde el hueso en respuesta a la reducción del pH sanguíneo, más que por la disminución de la calciemia, y esto podría hacer que la concentración sanguínea de potasio fuese similar entre los individuos que consumen las diferentes dietas (Ross *et al.*, 1994). Goff y Horst (1997) utilizaron tres dietas con diferente contenido de potasio (1,1, 2,1 y 3,1% MS), y a pesar de ser grandes las diferencias en la ingesta de potasio, no detectaron variaciones en las concentraciones séricas de este mineral. Pero el aspecto más interesante de este trabajo es que manteniendo constante la concentración de calcio y variando la de potasio, pudieron comprobar que la incidencia de la paresia puerperal dependía más del contenido de potasio de la dieta que del calcio.

En relación al cloro, Block (1984) observó, al igual que se había descrito con anterioridad en otras especies (Sauveur y Mongin, 1978), que la concentración plasmática de cloro variaba de acuerdo a la ingesta del mineral en la dieta. Posteriormente, Chan *et al.* (2006) utilizaron dos dietas aniónicas con distintos niveles de calcio (0,99 y 1,50% de MS) y observaron que la dieta con un 0,99% de calcio obtuvo una concentración de cloro superior a la de 1,50%. También en terneros se ha comprobado que los que se alimentan con dietas bajas en calcio tienen niveles sanguíneos superiores de cloro (Jackson y Hemken, 1994).

AUTOR	FÓRMULA DCAD	DCAD (meq/kg MS)	Sodio (mEq/l)	Potasio (mEq/l)	Cloro (mEq/l)
Roche <i>et al.</i> , 2003	(1)	+50	146,20	4,84	107,79
		+7	146,12	4,87	107,93
Chan <i>et al.</i> , 2006	(1)	-60,00 ^(a)			105,07
		-60,00			104,11
		-50,57 ^(b)			101,49
		-60,02 ^(c)			105,66
Li <i>et al.</i> , 2008	(4)	+224	136,20	3,76	101,70
		+151	139,00	3,63	97,40
		-265	140,07	3,48	104,90
Charbonneau <i>et al.</i> , 2009	(1)	+232	139	3,90	103,00
		-21 ^(d)	139	3,80	105,00
		-32	140	4,00	107,00
Seifi <i>et al.</i> , 2010	(1)	+192	151,53	5,14	101,89
		-82	151,57	4,88	100,63

Tabla 4: Efectos de la administración de sales aniónicas en rumiantes en el sodio, potasio y cloro. (a) novillas. (b) 1,50% Ca. (c) 0,99% Ca. (d) forrajes bajos en potasio. (1). DCAD: $(Na^+ + K^+) - (Cl^- + S^{2-})$ mEq/kg MS (Ender *et al.*, 1962; Block, 1984). (4) DCAD: $(Na^+ + K^+ + 0,38 Ca^{+2} + 0,30 Mg^{+2}) - (Cl^- + 0,60SO_4^{2-})$ mEq/kg MS (NRC, 1989).

3.2.2.2.5. SALES ANIÓNICAS Y HORMONAS CALCITRÓPICAS.

Existen diversos trabajos en los que se han evaluado los efectos de una DCAD negativa en las hormonas que regulan la homeostasis cálcica, principalmente, PTH y calcitriol. Al igual que hemos comprobado en otras secciones de nuestra revisión bibliográfica, existen varias teorías para explicar las consecuencias de la modificación de la DCAD en la concentración de estas hormonas y así de nuevo podemos encontrarnos con resultados contradictorios. Es complicado poder comparar todos los resultados hallados sobre el empleo de las sales aniónicas, porque en los distintos estudios analizados existe mucha variabilidad en el contenido en calcio de la dieta y la DCAD.

La hipótesis más aceptada es que la acidosis metabólica leve, inducida por las sales aniónicas, aumenta la sensibilidad de tejidos como el riñón y el hueso a la acción de la PTH (Goff, 2000). Así, en ratas se observa que el hueso, y quizás el riñón, son refractarios a la acción de la PTH en un estado de alcalosis metabólica mientras que, en condiciones de acidosis, las acciones estimuladoras de la PTH se verían incrementadas (Beck y Webster, 1976).

Goff *et al.* (1991) fueron los primeros investigadores en poner de manifiesto que las vacas alimentadas con una dieta rica en cationes parecen tener una menor respuesta a la PTH que las que ingerían las sales aniónicas. En 1994, Abu Damir *et al.* encontraron una elevación en la concentración de calcitriol en las vacas que consumían la ración aniónica sin que hubiese diferencias en los niveles séricos de calcidiol ni de PTH entre los animales que ingerían las diferentes dietas. Esta observación confirma la mayor actividad de la 1- α -hidroxilasa renal en las vacas con la ración aniónica.

En otro trabajo, Goff y Horst (1997) valoraron si los efectos detectados en las hormonas calciotrópicas, en las vacas alimentadas con una dieta catiónica, eran debidos a un catión en particular (sodio o potasio). Comprobaron que la concentración de PTH se incrementaba a medida que la cantidad de potasio y sodio de la dieta era mayor, pero el calcitriol no se veía afectado por los niveles de sodio y su concentración aumentaba al elevar el porcentaje de potasio de la dieta, aunque en menor proporción que lo hacía la PTH. Esto refrenda de nuevo la hipótesis de que la alcalosis metabólica parece reducir la producción renal de calcitriol, independientemente, del catión que la induce.

Además de cuantificar las variaciones en los niveles de las hormonas calciotrópicas al modificar la DCAD, Goff *et al.* (1995) trabajaron también sobre la posibilidad de que existiese un efecto de la dieta en la sensibilidad de los diferentes tejidos al calcitriol. Y efectivamente, las vacas que consumían la dieta aniónica tenían un número mayor de receptores para la vitamina D (VDR) en la mucosa del colon que las que ingerían dieta catiónica, por lo que con concentraciones más bajas de calcitriol podrían mostrar una mayor respuesta.

Joyce *et al.* (1997) constataron que las variaciones en la concentración de calcitriol y PTH, entre vacas que recibían una dieta rica en aniones o rica en cationes, eran los esperados ante un descenso de los niveles de calcio iónico en plasma. Las vacas que consumían la dieta con una DCAD positiva mostraban una concentración de calcio iónico más baja que las de una DCAD negativa y, consecuentemente, presentaban niveles mayores de PTH y calcitriol en suero. En ovejas, Espino *et al.*, (2003) también comprobaron este tipo de comportamiento de la PTH después del parto, ya que observaron una mayor concentración de esta hormona en los animales que consumían una dieta alcalinizante, estando las concentraciones de la misma inversamente relacionadas con las concentraciones de calcio iónico.

Más recientemente, Liesegang *et al.* (2007) realizaron un estudio en el que utilizaron cuatro grupos de animales. Dos de ellos fueron alimentados con dietas bajas en calcio (3 gr/kg de MS) y a mayores uno de ellos recibió sales aniónicas; a los dos restantes se le administró una dieta rica en calcio (7 gr/kg de MS) y a uno de ellos se les suministró además una dieta aniónica. Los niveles de PTH no variaron significativamente en ninguno de los grupos. Con respecto al calcitriol, su concentración aumentó en los cuatro lotes, por lo que en este trabajo no se observa ningún efecto sobre los órganos diana; pero, fue significativamente más baja en el grupo que recibió una dieta rica en calcio y sales aniónicas. La explicación más probable a este hecho es que al estar la dieta acidificada se induciría una absorción más eficiente de calcio a través del transporte pasivo en vez de la vía activa regulada por el calcitriol (Schonewille *et al.*, 1994).

Por último, Kurosaki *et al.* (2007) estudiaron el empleo de sales aniónicas para prevenir la incidencia de la fiebre de la leche. Para ello establecieron tres lotes de vacas multíparas: uno con sales aniónicas; otro sin sales aniónicas, pero con un suplemento de calcio y magnesio y un grupo control. En este experimento comprobaron que el patrón de secreción de la PTH en el posparto era diferente dentro de cada grupo y no estaba asociado con la incidencia de hipocalcemia dentro de cada lote. Tampoco hubo relación entre la concentración de calcitriol y la incidencia de la fiebre de la leche.

3.2.2.2.6. TIEMPO DE ADMINISTRACIÓN DE LA DIETA ANIÓNICA.

En los distintos trabajos consultados, observamos una gran variedad en cuanto a la duración en la que los animales recibían una ración con sales aniónicas en el parto.

A la hora de seleccionar cuanto tiempo deben ingerir una dieta aniónica las vacas secas, debemos saber que las sales aniónicas suministradas dos veces al día a animales a los que previamente se les practicó una fístula ruminal, inducen cambios en el estado ácido-base a las 24 horas de la administración (Goff y Horst, 1998; Frömer, 2004; Löffler, 2004; Roche *et al.*, 2007). También, aproximadamente a los 9 días, las dietas con una baja DCAD mejoran la absorción de calcio (Roche *et al.*, 2007).

Aunque como hemos visto las sales aniónicas ya producen cambios a las 24 horas de administrarlas, no nos debemos olvidar que el objetivo principal de la manipulación de la DCAD en el parto debería de ser reducir la incidencia de hipocalcemia, y no necesariamente modificar el pH sanguíneo o urinario (DeGaris y Lean, 2008a).

En el caso de animales alimentados con raciones totalmente mezcladas, la duración ideal para observar los efectos preventivos deseados estaría entre las 3 y 4 semanas (Staufenbiel, 2000; Goff y Horst, 2003b; Goff, 2006; Pelletier *et al.*, 2008).

En la revisión y meta-análisis llevado a cabo por Lean *et al.* (2006) proponen la siguiente ecuación para poder predecir la incidencia de la fiebre de la leche:

$$\% \text{ hipocalcemia: } e^{LT} / (1+e^{LT}) * 100$$

Donde LT es la transformación logit de las ecuaciones de regresión logística para predecir la incidencia de hipocalcemia en el ganado de raza frisona en función de los nutrientes de la alimentación preparto (% MS), de la DCAD calculada como $(Na^+ + K^+) + (Cl^- + S^{2-})$ en mEq/100 gr MS, y los días de exposición a la dieta preparto. Estos autores sugieren dos modelos:

$$LT1: -5,76+5,48(Ca)-5,05(Mg)+1,85(P)+0,02(DCAD)-2,03(Ca^2)+0,03 \text{ (días de exposición a la dieta)}$$

$$LT2: -5,17+5,74(Ca)-8,66(Mg)+2,30(P)+0,78(K)-3,48(S)-2,16(Ca^2)+0,04 \text{ (días de exposición a la dieta)}$$

Sobre la utilización de LT1 o LT2 prefieren la utilización de LT1 por la forma de calcular la DCAD. Esta idea se ve refrendada porque como vimos en el apartado “administración de sales aniónicas en el preparto” la ecuación más apropiada para predecir el efecto de la dieta sobre el riesgo de sufrir hipocalcemia es la $DCAD = (Na^+ + K^+) + (Cl^- + S^{2-})$ (DeGaris y Lean, 2008a). Los efectos de manipular las variables sobre el riesgo de sufrir la fiebre de la leche se pueden ver en la tabla 5.

Variable	Efecto de incrementar la variable sobre el riesgo de hipocalcemia	Odds ratio	P
Raza (Holstein o Jersey)	↑	2,321	0,02
Calcio	↑	293,362	0,01
Calcio*Calcio	↑ y ↓	0,131	0,01
Magnesio	↑	0,006	0,002
Fósforo	↑	6,373	0,01
DCAD=(Na ⁺ +K ⁺) -(Cl ⁻ + S ²⁻) mEq/100gr MS	↑	1,105	0,04
Días de exposición a la dieta (12-60 días)	↑	1,030	0,03

Tabla 5: Efecto de las variables predictoras del riesgo de sufrir hipocalcemia calculadas en la ecuación LT1 (Lean *et al.*, 2006).

Durante el desarrollo de este meta-análisis, estos investigadores observaron una interesante interacción entre el efecto cuadrático del calcio y los días de exposición a la dieta preparto (figura 10).

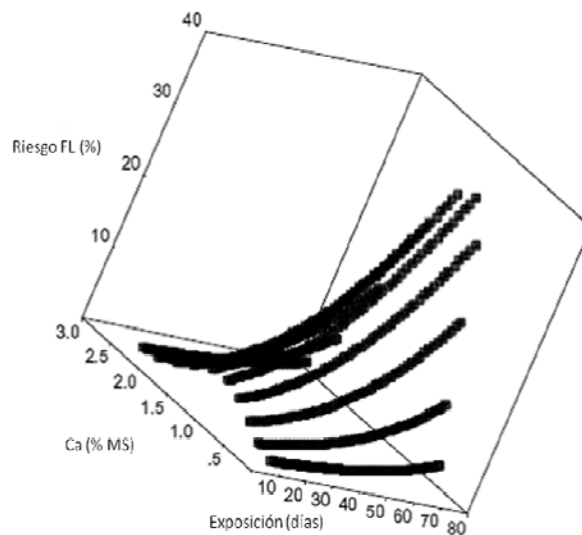


Figura 10: Relaciones entre el riesgo de sufrir hipocalcemia, días de exposición a la dieta preparto y calcio en la dieta (%MS) junto con una alta DCAD. (Modificado de Lean *et al.*, 2006).

Así, mientras distintas recomendaciones han sugerido que son necesarias altas concentraciones de calcio de aproximadamente un 1% y grandes ingestiones de materia seca preparto con una baja DCAD, estos autores evidencian que este planteamiento es erróneo ya que el efecto de calcio y la interacción entre el calcio y largas exposiciones a la dieta preparto, son independientes de la DCAD. Como se puede observar en la figura 10, exposiciones cortas (12-18 días) a la dieta preparto con altas concentraciones de calcio incrementan el riesgo de padecer hipocalcemia. También, las vacas que se alimentan con sales aniónicas en el preparto durante más de 20 ó 30 días incrementan el riesgo de sufrir fiebre de la leche en un 42%.

Husband *et al.* (2006) también observaron que en las dietas de transición cuando se añade a estas carbonato cálcico como fuente de calcio, la incidencia de hipocalcemia se incrementa a pesar de tener una DCAD baja. La explicación a este problema no está lo suficientemente clara y existen dos hipótesis que podrían explicar este fenómeno. La primera relacionaría la capacidad tampón del anión carbonato y la liberación de bicarbonato al torrente circulatorio; y la segunda tendría que ver con el ión calcio, ya que como vimos existen diversas ecuaciones para calcular la DCAD que utilizan este mineral en la parte catiónica de la fórmula (Goff, 2000). Por lo que debemos tener en cuenta, que al usar sales aniónicas en la ración preparto, con frecuencia estamos aumentando la concentración de calcio entre un 1,1 y un 1,3 % sobre MS; y este nivel de calcio se ha asociado con el pico de máximo riesgo para que una vaca sufra hipocalcemia (Mulligan y Doherty, 2008).

Así, como recomendación práctica podemos decir que cuando a pesar de utilizar sales aniónicas en la ración y tengamos una DCAD próxima a cero o negativa y sigan existiendo problemas de hipocalcemia deberemos revisar las fuentes de calcio, siendo la opción preferente el sulfato de calcio en vez de el carbonato cálcico (Husband *et al.*, 2006).

3.2.2.2.7. SALES ANIÓNICAS E INCIDENCIA DE LA PARESIA PUERPERAL Y OTRAS PATOLOGÍAS DEL POSPARTO.

Aunque no hay tratamientos que puedan eliminar completamente la aparición de la fiebre de la leche, varios experimentos indicaron que la adición de sales aniónicas a la ración disminuye la tasa de incidencia de la enfermedad en más de un 50% en relación a la dieta catiónica (Oetzel, 1993).

Block (1984) encontró una incidencia de la paresia puerperal del 47,4% en las vacas con DCAD positiva mientras que en el grupo con DCAD negativa el número de animales enfermos era casi nulo. Sin embargo, en este trabajo, la ración base estaba formulada con un ratio calcio/fósforo que favorecía la aparición de esta enfermedad y, además, presentaba un alto contenido en calcio lo que generaba unas condiciones óptimas para la utilización de las sales aniónicas. Roche *et al.* (2003) observaron una incidencia de la hipocalcemia clínica del 30% y del 0% (con una DCAD del +50 y +7 mEq/kg MS, respectivamente) y una disminución de la incidencia de la hipocalcemia subclínica del 78% al 15% (con una DCAD del +50 y +7 mEq/kg MS, respectivamente) en las dietas administradas con sales aniónicas. En otros experimentos, no encontraron diferencias significativas en la tasa de vacas afectadas por la paresia puerperal, aunque la hipocalcemia subclínica fue más severa para los individuos del grupo control que los que consumían la dieta aniónica (Gant *et al.*, 1998). Los datos de numerosos experimentos han documentado reducciones importantes en la aparición de hipocalcemia subclínica (Kurosaki *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2008; Seifi *et al.*, 2010), lo que resultaría en una mejoría de las contracciones ruminales (Jorgensen *et al.*, 1998), disminución de la letargia y mejoría del apetito al inicio de la lactación (Tucker *et al.*, 1992). Estos resultados sugirieron que las vacas alimentadas con una DCAD negativa tenían una menor probabilidad de desarrollar enfermedades relacionadas con la hipocalcemia subclínica.

Kurosaki *et al.* (2007) también analizaron el número de días y de tratamientos necesarios para curar a los animales con hipocalcemia clínica, y constataron que el grupo con sales aniónicas y una DCAD baja necesitó menos de la mitad de días para recuperar, que los grupos sin sales aniónicas o el grupo control. También observaron que la administración de suplementos de calcio añadidos solos, sin sulfatos y sin sales de cloro, no contribuyen a mejorar la incidencia de la hipocalcemia.

La incidencia de otras patologías del posparto de forma aislada no mostraba diferencias significativas. Así, no hubo diferencias estadísticas en los animales que presentaban desplazamiento de abomaso y/o cetosis entre dietas con DCAD positiva y negativa (Wu *et al.*, 2008; Seifi *et al.*, 2010), aunque si se observa una prevalencia más baja en los grupos de vacas con una DCAD baja que en los lotes con una DCAD positiva (Wu *et al.*, 2008). El uso de un número reducido de animales, junto con la baja incidencia de estas patologías, hace que sea difícil detectar diferencias entre grupos (Goff y Horst, 1997).

También, se han realizado diversos experimentos para establecer el efecto del consumo de dietas con una DCAD negativa en la incidencia de patologías reproductivas. Así, DeGaris y Lean (2008a) han descrito mejorías sustanciales en función de los días que los animales recibieron la dieta. Dividieron el estudio en tres grupos, menor de 10 días, entre 10 y 20 días, y mayor de 20 días. Como resultado obtuvieron que la tasa de preñez acumulada fue más elevada en el grupo que ingirió sales aniónicas en más de 20 días. Por otra parte, Seifi *et al.* (2010) estudiaron el intervalo parto-primera inseminación y el intervalo parto-inseminación fecundante, pudiendo constatar que no existían diferencias entre los resultados de las dietas.

En 1988, Oetzel *et al.* ya habían publicado una reducción en el número de vacas con retención de placenta en el grupo que consumía las sales aniónicas antes del parto. También, Wu *et al.* (2008) y Brozos *et al.* (2009) encontraron una tasa menor de retención placentaria en el grupo alimentado con una dieta aniónica. Por el contrario, Goff y Horst (1997); Joyce *et al.* (1997); Goff y Horst (1998) y Seifi *et al.* (2010) no detectaron diferencias ni en la incidencia de metritis ni de retención de placenta entre grupos.

Además, recientemente se ha visto un efecto muy positivo de las sales aniónicas administradas en el parto, como es una disminución en la tasa de eliminación de los animales. Seifi *et al.* (2010) observaron una tasa de eliminación del 4,57% (un animal eliminado de 22) y 27,6% (ocho animales eliminados de 22) para vacas alimentadas con sales aniónicas y dietas control respectivamente ($p = 0,03$). Aunque el efecto de la DCAD sobre este índice es muy difícil de valorar porque intervienen múltiples factores, en este estudio ocho de las nueve vacas eliminadas sufrieron hipocalcemia y cojeras, por lo que es razonable la hipótesis de que una disminución en la dieta de la DCAD durante el periodo seco indirectamente disminuye la tasa de eliminación.

En la tabla 6 resumimos los resultados de las principales investigaciones en las que se estudió la incidencia de la paresia puerperal y otras patologías del puerperio, cuando se empleaban sales aniónicas en el parto.

AUTOR	FÓRMULA DCAD	DCAD (mEq/kg MS)	N	FL (%)	HPS (%)	RP (%)	M (%)	C (%)	DA (%)
Melendez <i>et al.</i> , 2003	(1)	-80	160	1,3		28,8	51,9	8,8	6,3
		-80 ^(a)	158	0		22,8	49,4	7,6	2,5
		-80 ^(b)	161	0		31	54,0	9,3	3,1
Roche <i>et al.</i> , 2003	(1)	+50	20	30	78				
		+7	20	0	15				
Chan <i>et al.</i> , 2006	(1)	-50,57 ^(c)	11	0		0			
		-60,02 ^(d)	10	0		20			
Kurosaki <i>et al.</i> , 2007	(1)	+153 ^(e)	10	0	0				
		+153	10	40	20				
		+146	10	20	40				
		+12	10	11	22				
Wu <i>et al.</i> , 2008	(1)	+127	10	20	0	40			10
		+30	10	30	0	20			0
		-63	10	0	0	0			11
		-154	10	0	0	0			0
Brozos <i>et al.</i> , 2009	(1)	+205,38	230			17,8			
		+95,65	226			10,6			
Ramos-Nieves <i>et al.</i> , 2009	(1)	+11	20	10	50				
		-15	21	5	50				
Seifi <i>et al.</i> , 2010	(1)	+192	30		17	16		13	
		-82	30		3	10		20	

Tabla 6: Incidencia de las principales patologías del periparto en función de diferentes DCAD según diversos autores. (FL: Fiebre de la leche; HPS: Hipocalcemia subclínica; RP: Retención de placenta; M: Metritis; C: Cetosis; DA: Desplazamiento de abomaso). (a) Sales aniónicas más un suplemento de CaCl₂ oral 6 horas antes del parto. (b) Sales aniónicas más un suplemento de propionato cálcico más propilenglicol oral 6 horas antes del parto. (c) 1,50% Ca. (d) 0,99% Ca. (e) Novillas. (1). DCAD: (Na⁺ + K⁺) - (Cl⁻ + S⁻²) mEq/kg MS (Ender *et al.*, 1962; Block, 1984)

3.2.2.2.8. LIMITACIONES DEL USO DE LAS SALES ANIÓNICAS.

3.2.2.2.8.1. REDUCCIÓN DE LA INGESTA DE ALIMENTO.

La mayor parte de los problemas relacionados con las sales aniónicas giran alrededor de la reducción en la ingesta de materia seca debido a la mala palatabilidad de estos compuestos (Goff y Horst, 2003a) y por el manejo cuidadoso que requieren para asegurar su ingestión (Oetzel y Barmore, 1993). Además de su escasa palatabilidad, la acidosis metabólica, asociada al uso de este suplemento dietético, también podría contribuir a la reducción de la ingesta de alimento. Se ha demostrado que los cambios en el estado ácido-base sanguíneo

ejercen un efecto directo en las áreas hipotálamicas que controlan la ingesta de alimento observándose que la acidosis la aminora (Seoane *et al.*, 1975).

Los principales trabajos llevados a cabo para valorar los efectos de las sales aniónicas, en dietas preparto con distintas DCAD, sobre la ingestión de materia seca los podemos ver resumidos en la tabla 7.

AUTOR	FORMULA DCAD	DCAD (mEq/kg MS)	INGESTIÓN DE	INGESTIÓN DE
			MATERIA SECA EN VACAS MULTÍPARAS (kg/día)	MATERIA SECA EN VACAS PRIMÍPARAS (kg/día)
Roche <i>et al.</i> , 2003	(1)	+50	9,9	
		+7	9,0	
Chan <i>et al.</i> , 2006	(1)	-50,57 ^(a)	11,8	
		-60,02 ^(b)	10,6	
Li <i>et al.</i> , 2008	(4)	+224	11,5	
		+151	14,3	
		-265	13,0	
		+127	12,06	
Wu <i>et al.</i> , 2008	(1)	+30	12,05	
		-63	11,94	
		-154	11,87	
		+232	12,0	
Charbonneau <i>et al.</i> , 2009	(1)	-21 ^(c)	11,5	
		-32	9,8	
		+110	15,6	
Ramos-Nieves <i>et al.</i> , 2009	(1)	-150	14,4	
		+221	14,4	11,8
Degroot <i>et al.</i> , 2010	(1)	-121 ^(d)	14,4	11,3
		-113 ^(d)	14,3	11,9
		-98	14,2	12,5

Tabla 7: Efecto de las variaciones en la DCAD y su influencia en la ingestión de materia seca. (a) 1,50% Ca. (b) 0,99% Ca. (c) forrajes bajos en potasio. (d) alimentos acidificados, no sales aniónicas. (1). DCAD: $(Na^+ + K^+) - (Cl^- + S^{2-})$ mEq/kg MS (Ender *et al.*, 1962; Block, 1984). (4) DCAD: $(Na^+ + K^+ + 0,38 Ca^{+2} + 0,30 Mg^{+2}) - (Cl^- + 0,60SO_4^{2-})$ mEq/kg MS (NRC, 1989).

El meta-análisis realizado por Spanghero (2004) analiza 21 trabajos, con un total de 86 dietas, en vacas frisonas secas y preñadas que recibieron una alimentación en el preparto con sales aniónicas durante aproximadamente 3 semanas antes del parto. También se

incluyó algún estudio que utilizaba otras razas, e incluso, ocasionalmente, novillas y vacas improductivas (secas y no preñadas). El promedio de ingestión de materia seca fue de 9,9 kg/día pero con una distribución de entre 7,3 y 16 kg/día. Hayirli *et al.*, (2003) recopilando 16 trabajos que sólo incluían vacas frisonas comprobó una reducción exponencial en la ingestión de materia seca en los últimos 20 días de gestación desde 19-20 a 14-15 gr/kg de peso vivo. El promedio de ingestión de materia seca, para este investigador, en las tres últimas semanas de gestación fue de 16,3 y 17,7 gr/kg de peso vivo para novillas y vacas, respectivamente. En el meta-análisis de Spanghero (2004) el promedio de ingestión de materia seca fue de 15 gr/kg de peso vivo. Esta variación con respecto a lo observado por Hayirli *et al.*, (2003) puede ser debida a la inclusión por parte de Spanghero (2004) de trabajos con razas distintas a la Holstein con menos capacidad de ingesta de materia seca, a lo que también se añadiría el efecto depresor de las sales aniónicas.

Como se puede observar en la tabla 7, el consumo de sales aniónicas provoca una disminución en la ingestión de materia seca, pero como en otros apartados de este trabajo, encontramos resultados controvertidos. Así, mientras diversos estudios han encontrado una disminución significativa en la ingestión (Oetzel y Barmore, 1993; Horst *et al.*, 1997; Joyce *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 2000; Hu y Murphy, 2004; Hu *et al.*, 2007b), por el contrario otros autores han hallado incrementos en el consumo (Goff y Horst, 1997,1998; Oetzel *et al.*, 1988; Vagnoni y Oetzel, 1998, Li *et al.*, 2008) y otros investigadores no observaron ningún efecto (Roche *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2007; Charbonneau *et al.*, 2009; Ramos-Nieves *et al.*, 2009; Degroot *et al.*,2010).

Degroot *et al* (2010) sugieren que es probable que en los rebaños con un excelente manejo de la alimentación, lo cual se manifiesta con una alta ingestión de materia seca, no experimenten disminuciones en la ingestión del alimento al consumir dietas con una baja DCAD. Estos mismos autores publicaron un estudio en el cual administraron sales aniónicas en el parto a vacas primíparas y multíparas y observaron que la ingestión de materia seca en el posparto fue mayor para las vacas multíparas y primíparas que recibieron sales aniónicas que para los animales del lote control. Otros autores han demostrado que la alimentación con las sales aniónicas en el parto no disminuye la ingestión de materia seca en el posparto (Goff y Horst, 1998; Gulay *et al.*, 2004) o incrementa la ingestión de materia seca en dicho periodo (Joyce *et al.*, 1997).

La DCAD óptima para reducir la prevalencia y la severidad de la hipocalcemia y minimizar la disminución en la ingestión de materia seca todavía no ha sido establecida (Heron *et al.*,

2009). Se ha sugerido que la DCAD necesita estar entre -50,0 a -100,0 mEq/kg MS para prevenir la hipocalcemia (Horst *et al.*, 1997), pero también se ha comprobado que dietas con baja pero positiva DCAD pueden mejorar la homeostasis cálcica en los momentos próximos al parto (Kurosaki *et al.*, 2007; Penner *et al.*, 2008). Sin embargo, si se ha verificado que añadiendo más de 300 mEq/ kg MS a la dieta, se reduce sustancialmente la ingestión de materia seca en las dietas preparto de las vacas (Charbonneau *et al.*, 2006).

Por lo tanto, a modo de recomendaciones generales podemos resumir que para minimizar la disminución de la ingestión de materia seca al utilizar sales aniónicas:

- i. Son mejores las raciones totalmente mezcladas ya que podemos emplear alimentos muy palatables como silo de maíz, alfalfa o melazas para enmascarar el sabor de las sales (Oetzel, 1993). En donde no se pueda emplear el carro mezclador es mejor utilizar pellets de sales aniónicas con melazas o con granos de destilería (Wu *et al.*, 2008).
- ii. En ningún caso se debe sobrepasar el límite de corrección acidogénica de 3.000 mEq/día, ya que dosis superiores pueden afectar muy negativamente a la ingesta de alimento (De Blas *et al.*, 1999). Si la ración base tiene una DCAD muy positiva habrá que sustituir el alimento con mayor contenido de cationes.
- iii. Monitorizar el pH urinario ya que si es inferior a 7.0 podría disminuir la ingesta de materia seca sin que se observen beneficios adicionales en la prevención de la hipocalcemia.

3.2.2.2.8.2. PRODUCCIÓN Y LA CALIDAD DE LA LECHE.

La producción de leche está limitada por la ingestión de materia seca (Kertz *et al.*, 1991). A pesar de que la menor ingesta de alimento, asociada a la utilización de una DCAD negativa, podría hacernos pensar en una reducción en la producción de leche, son más numerosos los trabajos que hablan de efectos beneficiosos, o incluso que no citan contraindicaciones, que los que observan reducciones en la producción y calidad láctea. Así, diversos autores no han encontrado que el empleo de sales aniónicas en el preparto tengan una influencia negativa o positiva sobre la producción y/o la calidad láctea (Oetzel *et al.*, 1988; Goff *et al.*, 1991; Joyce *et al.*, 1997; Roche *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 2006; Ramos-Nieves *et al.*, 2009; Seifi *et al.*,

2010). En la tabla 8 se recopilan diferentes promedios de producción láctea en función de las distintas DCAD y de los días de estudio.

West *et al.* (1992) describieron un ascenso en la producción de leche, aunque no había diferencias estadísticamente significativas en la producción de leche total, leche corregida al 3,5% de grasa y leche corregida al 3,5% de grasa/kg MS ingerida, a medida que aumentaba la DCAD consumida. También encontraron que la leche de las vacas que consumían las dietas con DCAD positiva mostraba un mayor porcentaje de grasa y proteína.

En una posición opuesta, diversos investigadores obtuvieron elevaciones de la producción de leche. Así, Block (1984) se encontró con un aumento del 6,8% en vacas que ingerían raciones suplementadas con sales aniónicas. Esta mejoría podría estar asociada a la reducción en la incidencia de la hipocalcemia clínica y subclínica en los animales que recibían la ración con una DCAD negativa. También en este mismo estudio observó que la diferencia en la cantidad de leche producida, era más alta entre las vacas que padecían puerperal y las sanas (que producían un 14% más) dentro del grupo con dieta catiónica, que la diferencia entre vacas con dieta catiónica y aniónica.

Dentro de esta línea Wu *et al.* (2008), aunque no encontraron diferencias significativas, observaron que las vacas alimentadas con una DCAD de -150 mEq/kg MS produjeron más leche (3,36 kg/día) que las de una DCAD de +150 mEq/kg MS, probablemente por la mejora en su estado de salud. También, DeGaris *et al.* (2008b) demostraron que los animales sometidos, a dietas preparto con sales aniónicas, durante 22 ó 25 días mejoraban significativamente la proteína en leche, y la grasa y proteína corregida al 4,0% y al 3,2%, respectivamente. El incremento de la productividad láctea, entre una exposición mínima de 3 días y una óptima de 25 días fue de 3,75 litros (de grasa y proteína corregida al 4,0% y al 3,2%) y de 100 gramos de proteína por día durante los primeros 180 días de lactación. Estos efectos beneficiosos en la producción láctea son semejantes a los encontrados por Corbett (2002) y DeGroot (2004).

Por último, DeGroot *et al.* (2010) observaron una mayor producción de leche en vacas multíparas que recibieron sales aniónicas en el parto que en los animales del lote control (43,1 vs 36,6 kg/d; $p < 0,01$). La producción corregida al 3,5% de grasa fue significativamente superior en el grupo que recibió las sales aniónicas que en el control (50,2 vs 45,6 kg/d; $p < 0,05$). Estos autores atribuyen estos incrementos al aumento significativo en la ingestión de materia seca en el parto del lote alimentado con sales aniónicas con

respecto al control. Por el contrario, los porcentajes de grasa y proteína en la leche fueron similares para los dos grupos.

AUTOR	FÓRMULA DCAD	DCAD (mEq/kg MS)	N	PRODUCCIÓN DE LECHE (kg/día)	DÍAS PROMEDIO
Wu <i>et al.</i> , 2008	(1)	+127	10	32,03	30
		+30	10	33,12	
		-63	10	33,31	
		-154	10	34,42	
Ramos-Nieves <i>et al.</i> , 2009	(1)	+110	20	46,2	63
		-150	21	46,4	
Degroot <i>et al.</i> , 2010	(1)	+221	9	45,6	21
		-98	9	50,2	
Seifi <i>et al.</i> , 2010	(1)	+192	30	38,70	30
		-82	30	36,65	

Tabla 8: Producción de leche en función de diferentes DCAD según diversos autores. (1). DCAD: $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - (\text{Cl}^- + \text{S}^{2-})$ mEq/kg MS (Ender *et al.*, 1962; Block, 1984).

3.3 MARCADORES DEL METABOLISMO ENERGÉTICO: LEPTINA E INSULINA.

A parte de los efectos ya comentados sobre la concentración de calcio plasmático, ingestión de materia seca y producción lechera, en la actualidad se han realizado diversas investigaciones para saber cómo afectan las sales aniónicas administradas en el parto a las distintas hormonas, factores de crecimiento y metabolitos en el posparto (Ramos-Nieves *et al.*, 2009; Degroot *et al.*, 2010; Seifi *et al.*, 2010; Wathes, 2012).

En nuestro estudio nos centraremos en la leptina y la insulina por su importancia en informar al eje reproductivo del estatus del balance energético de los animales tanto en condiciones de pastoreo como intensivas (Butler, 2003; Meikle *et al.*, 2004).

3.3.1. LEPTINA.

La leptina es una proteína plasmática formada por 167 aminoácidos y de 16kD, que se transcribe a través del gen *ob* y fue aislada en el año 1994 por Zhang *et al.* Esta hormona peptídica podría jugar un papel central en la regulación de la homeostasis energética

(apetito, consumo de energía, reparto de nutrientes entre los tejidos y composición corporal), y también en la reproducción, en la secreción de hormonas por distintas glándulas endocrinas, en funciones renales e inmunes, hematopoyesis, angiogénesis, en la proliferación y diferenciación celular (Kershaw y Flier, 2004).

Aunque la leptina es secretada principalmente por los adipocitos, localizados en el tejido adiposo blanco (Ahima y Flier, 2000; Ingvarsen y Boisclair, 2001; Spiegelman y Flier, 2001), también el gen que codifica para esta proteína se ha encontrado en niveles mucho más bajos en la placenta y tejidos fetales, glándula mamaria, estómago, músculos y en otros tejidos diversos en roedores y humanos (Margetic *et al.*, 2002). En rumiantes, este gen se ha aislado en el tejido adiposo blanco (Chilliard *et al.*, 2001; Bernabucci *et al.*, 2006), tejidos fetales (Ehrhardt *et al.*, 2002; Yuen *et al.*, 2002; Muhlhausler *et al.*, 2003), glándula mamaria (Chelikani *et al.*, 2003b; Leury *et al.*, 2003; Drackley *et al.*, 2006), rumen, abomaso y duodeno (Yonekura *et al.*, 2002), y glándula pituitaria (Yonekura *et al.*, 2003). La leptina no sólo podría actuar como una señal endocrina en el cerebro y en los tejidos periféricos que tienen receptores para esta proteína, sino que también en los tejidos donde es producida funcionaría como una señal autocrina/paracrina tanto en roedores como en humanos (Huan *et al.*, 2003; Kershaw y Flier, 2004) y en rumiantes (Chelikani *et al.*, 2003b).

La secreción de esta hormona se ve influenciada por la estación del año y por factores ambientales (Accorsi *et al.*, 2005; Chilliard *et al.*, 2005). Así, las vacas que paren en agosto tienen una concentración plasmática más baja que las de primavera (Reist *et al.*, 2003). En otro estudio, también en vacas en posparto, los animales que estuvieron en el local cálido (10 °C versus 3 °C) tuvieron los niveles más altos de leptina (Kokkonen *et al.*, 2002).

3.3.1.1 FISIOLÓGIA DE LA LEPTINA.

3.3.1.1.1 LA LEPTINA Y EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPOFISARIO.

Dentro del sistema nervioso central, la leptina actúa principalmente a nivel del hipotálamo para controlar la ingestión de comida y gasto energético (Liefers *et al.*, 2005). El hipotálamo traduce las señales de esta hormona en respuestas neuronales, las cuales causan alteraciones en la ingestión de la comida (Henry y Clarke 2008; Konner *et al.*, 2009). En este proceso también está implicado el neuropéptido Y (NPY), ya que el NPY es un potente estimulador de la ingestión de alimento (Houseknecht *et al.*, 1998), y la leptina se une al receptor que posee en el NPY provocando un incremento en la producción de energía y

causando también hipofagia (Fruhbeck, 2006; Farooqi y O'Rahilly, 2009). La administración de leptina estimula la secreción de las gonadotropinas LH y FSH desde la hipófisis vía GnRH (Amstalden *et al.*, 2003). También, en la hipófisis anterior de las ovejas se han aislado receptores para esta hormona, por lo cual podría tener efectos directos sobre la producción de LH y FSH (Dyer *et al.*, 1997).

3.3.1.1.2. INGESTIÓN Y PESO CORPORAL.

Los efectos de la ingestión de alimentos sobre la expresión de la leptina pueden ocurrir a largo plazo (la grasa corporal cambia acorde el potencial genético o mediante cambios previos, de semanas o meses, nutricionales y fisiológicos), a medio plazo (después de días a un determinado nivel alimentario) o a corto plazo (minutos después de consumir alimentos) (Chilliard *et al.*, 2005).

Los niveles del ARNm para la leptina del tejido adiposo blanco y la leptinemia disminuyen bruscamente cuando existen condiciones de desnutrición o de restricción alimentaria (Block *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2005) y se incrementan cuando existen condiciones de sobrealimentación en las ovejas (Chilliard *et al.*, 2001; Tokuda *et al.*, 2002) y en el ganado vacuno (Chilliard *et al.*, 2001; Delavaud *et al.*, 2002; Janovick *et al.*, 2011). También dentro de esta línea, Chilliard *et al.* (2005) sugieren que generalmente la concentración de leptina en el plasma, en respuesta al nivel de alimentación, está fuertemente ligada a la grasa corporal.

Contrariamente a lo que se observa en humanos (Dallongeville *et al.*, 1998), la leptinemia no varía o se incrementa levemente después de comer en las ovejas (Blache *et al.*, 2000; Marie *et al.*, 2001; Dandrea *et al.*, 2002; Daniel *et al.*, 2002; Tokuda *et al.*, 2002). En el ganado vacuno se han descrito los siguientes cambios: vacas secas y no preñadas disminuye su concentración si están bien alimentadas, aumenta en condiciones de desnutrición y no varía en las últimas fases de gestación o en las primeras de lactación (Block *et al.*, 2001; Delavaud *et al.*, 2002; Blum *et al.*, 2005).

3.3.1.1.3. CAMBIOS DURANTE LA PREÑEZ Y DURANTE LA LACTACIÓN.

En el ganado vacuno lechero, durante el posparto, los animales presentan un estado de balance energético negativo por lo que se produce una movilización de las reservas de grasa y todo el alimento ingerido se destina al energéticamente costoso proceso de la lactogénesis (Chagas *et al.*, 2007). La leptina dentro de este proceso actúa como barómetro corporal

proporcionando un vínculo entre la homeostasis energética, el apetito y la función reproductiva (Bluher y Mantzoros, 2007; Zieba *et al.* 2008; Farooqi *et al.*, 2009).

La concentración de leptina es generalmente alta (5-9 ng/ml) en las vacas gestantes y secas un mes antes del parto (Kokkonen *et al.*, 2002), comienza a decrecer entre las semanas 4 y 1 preparto y alcanza un descenso (3-6 ng/ml) durante la primera semana posparto. Así que, en el periparto es frecuente observar disminuciones en la concentración plasmática de 3 ng/ml (Block *et al.*, 2001; Holtenius *et al.*, 2003; Hachenberg *et al.*, 2007; Konigsson *et al.*, 2008). Durante las 3-4 primeras semanas de lactación se produce un débil incremento, y de acuerdo con los distintos trabajos consultados, continúa aumentando suavemente o bien se produce un nuevo descenso a las 5-7 semanas posparto (Chilliard *et al.*, 2005). Sin embargo, el empleo de un RIA específico de rumiantes permite detectar un rápido incremento durante las semanas 1-2 (Blache *et al.*, 2000; Kadokawa *et al.*, 2000). Además, el nivel de ARNm para la leptina del tejido adiposo blanco subcutáneo es mayor entre la semana 4 y 1 antes del parto, y baja durante por lo menos entre la primera y octava semana de lactación (Block *et al.*, 2001). La leptinemia permanece baja durante la mitad y la última etapa de la lactación (Kadokawa *et al.*, 2000). También se observa este hecho en las vacas no gestantes (después de 17 meses de lactación) (Block *et al.*, 2003) y en las vacas preñadas (Chelikani *et al.*, 2003a; Sauerwein *et al.*, 2004).

Distintas hipótesis han sido propuestas para explicar la razón de porque la concentración plasmática de leptina disminuye cuando nos vamos acercando al momento del parto. Las principales son las dos que exponemos a continuación.

- i. Liefers *et al.* (2003) proponen que la concentración de leptina refleja el balance energético de la vaca. A medida que se encamina hacia el estado de lactación, el balance energético negativo ya empieza a iniciarse con un descenso en la ingestión de materia seca junto con un incremento de la demanda de energía del feto (Hayirli *et al.*, 2002). Como resultado del descenso en el tejido adiposo también disminuye la expresión de la leptina. Block *et al.* (2001) demostraron que existe una gran similitud entre el balance energético en el periparto y las curvas de la concentración plasmática de leptina. Por el contrario, Kokkonen *et al.* (2005) asocian la baja concentración de esta hormona en los primeros días de la lactación con la grasa corporal pero no con el balance energético estimado. El hallazgo de Block *et al.* (2001) sugiere que la movilización del tejido adiposo es la responsable del descenso de la leptinemia en las vacas que se aproximan al parto y la inhibición de la

expresión de esta hormona por parte del tejido adiposo podría ser una de las razones de que sus niveles permanezcan bajos durante la lactación. Este descenso en los niveles plasmáticos de leptina se ve compensado con un incremento en la cantidad de receptores a nivel hipotalámico (Adam *et al.*, 2002; Sorensen *et al.*, 2002a; Kurose *et al.*, 2005) y en tejidos periféricos, como el hígado y el tejido adiposo, (Thorn *et al.*, 2008) como sistema de asegurar las prioridades fisiológicas (Chilliard *et al.*, 2001).

- ii. Otra hipótesis se basa en que la regulación de la expresión de la leptina está influenciada por la insulina y la hormona del crecimiento. El comienzo del balance energético negativo está asociado a una disminución en la concentración de insulina y a un aumento en el plasma de la hormona del crecimiento (Block *et al.*, 2001; Accorsi *et al.*, 2005). Esta idea sugiere que ambas hormonas podrían mediar, también, en el efecto del balance energético sobre la concentración plasmática de leptina. Así, en roedores y humanos se ha visto que la insulina incrementa y la hormona del crecimiento disminuye la concentración plasmática de leptina (Ahima *et al.*, 2000); también, Block *et al.*, (2001) apreciaron este hecho en vacas en lactación. Leury *et al.* (2003) administraron estas dos hormonas a vacas entre las 5 a 2 semanas preparto y entre 1 a 5 semanas posparto, observando que la insulina aumentaba la concentración de la leptina incrementando la síntesis de tejido adiposo en el preparto pero sólo tenía efectos marginales en el posparto, mientras que la hormona del crecimiento no tuvo ningún efecto directo sobre los niveles de esta hormona. Los autores que concluyen que durante los primeros días del posparto otros factores, como el incremento de la respuesta del tejido adiposo a los estímulos β -adrenérgicos podrían contribuir a la disminución posparto de la leptina. Sauerwein *et al.* (2004) realizaron su estudio en vacas gestantes de 10 semanas y no preñadas de 100 días posparto y encontraron que sólo la hormona del crecimiento redujo la concentración de leptina en los animales gestantes de 10 semanas. Thorn *et al.* (2008) postulan que los cambios en los niveles de insulina podrían mediar en los efectos estimuladores del balance energético sobre de los receptores de leptina en los tejidos periféricos y el incremento de dichos receptores periféricos, durante el balance energético negativo, podría ser un mecanismo de atenuar la acción central de la leptina.

Así que, recapitulando estas corrientes, podríamos concluir que la disminución en la concentración plasmática de la leptina en los momentos peripartales es debida a distintos mecanismos (Parola *et al.*, 2007):

- La movilización del tejido adiposo.
- El descenso en la expresión de esta hormona en las células adiposas.
- La bajada en la concentración plasmática de la insulina.
- El balance energético.
- La ingestión de alimento.

3.3.1.1.4. CORRELACIÓN DE LA LEPTINA CON OTRAS HORMONAS Y LA CONDICIÓN CORPORAL.

La concentración plasmática de leptina ha sido correlacionada positivamente con la condición corporal y es un buen indicador del nivel de grasa corporal en el periparto de las vacas lecheras (Meikle *et al.*, 2004; Bradford *et al.*, 2006; Cavestany *et al.*, 2009). Wathes *et al.* (2007) observaron que en las vacas primíparas esta correlación sucede entre las semanas 2 y 7 posparto, en las vacas múltiparas antes del parto, y en ambos grupos los cambios en la pérdida de condición corporal que ocurren entre la semana 1 preparto y la 7 posparto. Así, Ehrhardt *et al.* (2000) sugieren que el estado de condición corporal en las últimas fases de gestación explicaría el 37% de la variación de la concentración plasmática de leptina. Garnsworthy *et al.* (2008) estudiaron la leptinemia en vacas entre los 40 y 70 días posparto alimentadas con cinco tipos diferentes de ración isoenergética, a las cuales sólo se les modificaba la concentración de grasa y almidón. Observaron que al no haber modificaciones en la condición corporal ni en la ingestión de materia seca tampoco las hubo en la concentración plasmática de leptina. Aunque al estudiar cada animal individualmente, sí que existe una relación entre la leptina y la ingestión de materia seca ($r = -0,44$), por lo que este hallazgo es consistente con el papel de la leptina en la regulación de ingestión de alimentos.

Por el contrario, Holtenius *et al.* (2003) y Chagas *et al.* (2006) no observaron cambios en la concentración plasmática de leptina asociados a la condición corporal o a la alimentación en el preparto. Chagas *et al.* (2006) sugieren que las vacas que poseen una baja condición corporal y que tienen una deposición grasa más significativa en los depósitos grasos internos

y no en los depósitos grasos subcutáneos, la concentración de esta hormona no se correlaciona con la condición corporal.

Las concentraciones de leptina en el preparto se incrementan con los tratamientos de glucosa, insulina y lípidos (Block *et al.*, 2003; Chelikani *et al.*, 2003a). La acción de la glucosa sobre la leptina no tendría que ver con un efecto directo sobre los adipocitos, sino más bien con acciones indirectas o a través de los ácidos volátiles (Kadokawa y Martin, 2006b).

Se ha observado que la concentración posparto de IGF-I está más fuertemente correlacionada con la leptina circulante que con la insulina (Chekilani *et al.*, 2004) y también existe una relación positiva con la frecuencia pulsátil de LH (Diskin *et al.*, 2003; Kadokawa *et al.*, 2006a). Por último, se ha comprobado una correlación positiva entre la leptina y la β -lactoglobulina ambas en plasma y en el suero (Parola *et al.*, 2007) y esta hormona in vitro, también, regula el efecto de la prolactina sobre la glándula mamaria (Feuermann *et al.*, 2008).

3.3.2. INSULINA.

La insulina es una hormona con una gran importancia en el control homeostático del metabolismo energético. Así, los daños en la regulación de esta hormona sobre el metabolismo energético son considerados como “una puerta de entrada” para las distintas enfermedades metabólicas (Holtenius y Holtenius, 2007). Durante el periodo del posparto, esta hormona sirve para predecir el estado metabólico y nutricional de las vacas lecheras (Cavestany *et al.*, 2009). Está correlacionada de forma positiva con la energía ingerida (Chillard, 1999), aunque el efecto de diversos tipos de piensos sobre los niveles plasmáticos de insulina puede ser diferente (Rabelo *et al.*, 2001; Robinson *et al.*, 2002). Durante el periodo de transición, entre el preparto y el posparto, la secreción pancreática de insulina y la sensibilidad de los tejidos insulino-dependientes están disminuidas como parte de la adaptación al estado fisiológico de la lactación (Bell y Bauman, 1997).

Esta hormona, como ya hemos visto, es clave en la regulación del reparto de los nutrientes desde los tejidos corporales hacia la producción de leche en el periodo de transición de la gestación hacia la lactación (Laarveld *et al.*, 1981). En el posparto, las vacas de alta producción, necesitan altas concentraciones de lactosa, por lo que esta situación conlleva a un descenso en la concentración de glucosa e insulina (Van Knegsel *et al.*, 2005). Las bajas

concentraciones de esta hormona reducen la captación de glucosa por parte del músculo y del tejido adiposo y facilitan el incremento en la captación de glucosa por parte de la glándula mamaria, Esto se debe a la ausencia de la isoforma número cuatro, la que se encarga del transporte de glucosa dependiente de insulina en las células del epitelio de la glándula mamaria (Bauman y Elliot, 1983; Drackley *et al.*, 2006).

El ganado vacuno lechero ha sido seleccionado para que exista una regulación en el fraccionamiento y ubicación de las reservas energéticas que soporte la producción láctea. Este hecho sucede a través de un mecanismo conocido como homeorhesis (Bauman, 2010), en el cual los mecanismos homeostáticos son parcialmente minimizados y temporalmente anulados, incluyendo un periodo fisiológico de insulino resistencia (Leblanc, 2010). Esta fase de insulino resistencia se define como una condición, en la cual para lograr repuestas metabólicas normales son necesarias concentraciones más elevadas de lo normal de insulina (Kahn, 1978). Esta etapa podría verse exacerbada por una excesiva movilización de lípidos con el consiguiente aumento plasmático en los niveles de los ácidos grasos libres no esterificados y cuerpos cetónicos, ambos en animales no gestantes, no lactantes (Oikawa y Oetzel., 2006; Pires *et al.*, 2007) y en vacas en lactación (Bossaert *et al.*, 2008). Sin embargo, esta situación no ha sido observada en vacas lecheras durante las primeras semanas de la lactación, en las cuales sufrieron pequeñas elevaciones en los niveles de los ácidos grasos libres y de betahidroxibutirato (Kerestes *et al.*, 2009).

Los niveles de insulina son más altos en los animales que presentan un balance energético positivo (Lucy, 2003), y por el contrario aquellos que reciben una alimentación deficitaria pueden tener unos niveles más bajos (O'Callaghan y Boland, 1999). Van Knegsel *et al.* (2007) encontraron que los animales que recibían una dieta glucogénica, comparada con los que se alimentaban con una dieta lipogénica, tenían una concentración más alta de insulina; y, por lo tanto, debido a los efectos anabólicos de esta elevación, el balance energético en el posparto fue menos negativo en estos animales. En esta línea se encuentran los resultados de VandeHaar y St-Pierre, (2006) quienes observaron que la concentración de insulina se eleva en las dietas ricas en cereales. También Cavestany *et al.* (2009), en vacas en condiciones de pastoreo suplementadas 21 días antes de la fecha del parto con maíz, hallaron que los niveles de insulina en el posparto eran mayores que los del grupo control. Además, debido a este cereal se incrementó la producción de propionato, este hecho ayudó a que se elevaran los niveles de esta hormona (Brockman y Laarveld, 1986).

Cabe destacar el estudio de Chan *et al.* (2005), en el cual midieron la concentración de la insulina en la segunda y sexta semana posparto en vacas primíparas y multíparas en lactación, en tres dietas con diferente DCAD (+200, +350 y +500. mEq/kg MS). Al comparar la concentración de insulina observaron que la concentración media de las tres dietas fue significativamente más baja en la segunda semana (8,4 μ IU/ml) que en la sexta (11,8 μ IU/ml). Los autores concluyen que probablemente el balance energético de estos animales fue más negativo en la segunda semana posparto.

Dependiendo del número de parto la concentración de insulina tiene diferentes connotaciones. Así en las vacas primíparas esta hormona no tiene tanta implicación en la producción lechera, mientras que en las vacas multíparas estos dos parámetros están correlacionados negativamente (Wathes *et al.*, 2007). Se ha demostrado que la insulina podría jugar un papel fundamental en el desarrollo folicular, porque en condiciones de restricción alimentaria o desnutrición al descender su concentración disminuye la sensibilidad del ovario a las gonadotropinas permitiendo un decrecimiento folicular (Lucy, 2008). También esta hormona, en recientes investigaciones (Türck y Leonhard-Marek., 2010), se ha visto que al aumentar su concentración extracelular dentro de límites patofisiológicos podría afectar a la contracción muscular del abomaso, mediante un incremento en la actividad de la Na/K ATPasa o incrementando la conductividad del K^+ o bien combinando ambos mecanismos, favoreciendo la patología del desplazamiento de abomaso.

Material y Métodos

4. MATERIAL Y MÉTODOS.

4.1. MATERIAL VIVO EXPERIMENTAL.

Para realizar el presente estudio hemos seleccionado un grupo de vacas de raza Holstein, en una explotación lechera comercial de la provincia de Lugo, localizada en Vilamaior de Negral, Guntín. Dicha explotación cuenta en la actualidad con 296 vacas adultas y 83 novillas de reposición. La producción de leche normalizada a 305 días de lactación ha superado los 10.000 kg en los últimos tres años.

Las vacas que hemos empleado en este trabajo eran multíparas, con un promedio de 2 partos, edad media de 4 años y 8 meses, no tenían antecedentes de hipocalcemia y se encontraban secas y gestantes. A todos los animales se les realizó una exploración clínica y un estudio bioquímico y análisis urinario básico, y una vez que se consideraron clínicamente sanos se dividieron aleatoriamente en dos lotes. Un grupo control de 20 animales y otro grupo con dieta aniónica de 30 animales, que por razones relacionadas con el éxito y duración de la gestación se vieron reducidos al final del estudio a 7 ejemplares en el grupo control y 10 en el grupo que consumía dieta aniónica. El manejo de los lotes fue el mismo y ambos grupos permanecieron en régimen semiextensivo, en una estabulación libre con cubículos, con libre acceso a la comida y al agua. La fase experimental se realizó durante los años 2004 y 2005 en base a la normativa vigente en aquel momento (Real Decreto 223/1988, del 14 de marzo y RD 1201/2005, del 10 de octubre).

4.2. ALIMENTACIÓN EXPERIMENTAL.

Las vacas consumieron la ración experimental correspondiente a su grupo, desde el día 21 preparto hasta el día del parto y la misma ración de lactación en ambos grupos después del parto. El alimento se administró en la cantidad suficiente para asegurar el consumo “ad libitum” de los animales y garantizar un 5 % de residuos de la cantidad original ofertada. Los ingredientes de la dieta se adicionaban a un carro mezclador y se ofrecían una vez al día como una ración completa totalmente homogénea entorno a las 11 horas. Los restos de

Material y métodos

comida del día anterior se eliminaron por completo en la mañana siguiente antes de suministrar la nueva ración.

Los ingredientes y la composición química de las tres dietas experimentales aparecen recogidos en las tablas 9 y 10:

INGREDIENTES	ANIÓNICA (%)	CONTROL (%)	LACTACIÓN (%)
Heno de ray-grass	34,90	35,29	
Silo de maíz	29,09	29,41	45,10
Silo de hierba	29,09	29,41	35,29
Concentrado (harina)	5,82	5,88	19,61
Sales aniónicas	1,11		

Tabla 9: Ingredientes utilizados en la formulación de cada ración.

NUTRIENTE	ANIÓNICA	CONTROL	LACTACIÓN	UNIDADES
Humedad	39,88	43,49	44,05	%
Cenizas	7,20	7,28	7,10	%
Proteína bruta	11,90	11,80	15,03	%
Fibra bruta	10,90	10,70	10,65	%
Grasa hidrólisis ácida	2,2	2,3	3,89	%
Fósforo	0,3	0,3	0,37	%
Sodio	1911	3856	4300	ppm
Potasio	6036	9418	10540	ppm
Calcio (Ca ⁺²)	5266	5155	6053	ppm
Magnesio	1870	1727	1902	ppm
Ión Cloruro	4721	3079	2600	ppm
Ión Nitrato	215	91	93	ppm
Ión Nitrito	0	0	0	ppm
Ión Sulfato	719	788	1900	ppm
DCAD	+59,65	+272,84	+264,99	mEq/kg MS

Tabla 10: Composición química de las tres dietas experimentales.

La combinación y tipo de las sales aniónicas empleadas las expresamos en la siguiente tabla:

INGREDIENTES	gr	%
Cloruro amónico	100	52,63
Sulfato de magnesio	54	28,42
Cloruro cálcico	36	18,95

Tabla 11: Combinación y tipo de las sales aniónicas.

Las tres raciones se formularon para cubrir las necesidades de vacas secas gestantes (NRC, 2001), excepto para el sodio, potasio, cloro, azufre y fósforo. Estos minerales cubrían o excedían las necesidades de los animales dependiendo de la DCAD de cada ración (tabla 10).

La DCAD fue calculada utilizando la ecuación $DCAD = (Na^+ + K^+) - (Cl^- + S^{-2})$ mEq/kg MS (DeGroot, 2010).

En base a la DCAD, hemos designado a las tres dietas como sigue:

Aniónica: DCAD = +59,65 mEq/kg MS. Para disminuir la DCAD se utilizó una combinación de cloruro amónico, sulfato de magnesio y cloruro cálcico con la intención de reducir la posible toxicidad y mala palatabilidad de las sales.

Control: DCAD = +272,84 mEq/kg MS. Incluye forrajes que se emplean de rutina en la alimentación de vacas secas en nuestra zona de trabajo.

Lactación: DCAD = +264,99 mEq/kg MS. Incluye forrajes que se emplean de rutina en la alimentación de vacas en lactación en nuestra zona de trabajo.

4.3. PROTOCOLO DE RECOGIDA DE MUESTRAS.

Desde el día 21 preparto hasta el día del parto las muestras fueron recogidas cada tres días. Debido a la dificultad de predecir con exactitud la fecha del parto y para facilitar el análisis estadístico de los datos, las muestras de sangre, recogidas en este periodo anterior al parto, pueden presentar variaciones de +/- 24 horas, asignando como día definitivo de muestreo la fecha que mayor número de muestras agrupaba, tal como figura en la tabla 12.

Material y métodos

Posteriormente, hicimos el muestreo el día del parto, a las 24 horas, a las 48 horas, a los 7 días y así consecutivamente cada 7 días hasta el día 28 posparto.

En todas las extracciones, y con el fin de evitar interferencias derivadas de la posible existencia de ritmos circadianos en alguno de los parámetros objeto de estudio, estandarizamos la toma de muestras de manera que todas las obtuvimos, aproximadamente a la misma hora, entre las 8 y las 10 de la mañana, antes de recibir la ración del día. Además, el hecho de que la toma de muestras fuese realizada antes de consumir el alimento eliminó la posibilidad de cambios en el estado ácido-base relacionados con la ingesta reciente de alimento (Van Mosel *et al.*, 1993).

En la tabla 12, se resume el protocolo de toma de muestras y los análisis realizados.

Análisis	Estado ácido-base	Minerales sanguíneos	Hematología	Leptina e insulina	PTH
-21d	x	x	x	x	x
-17d	x	x	x	x	x
-14d	x	x	x	x	x
-12d	x	x	x	x	x
-10d	x	x	x	x	x
-5d	x	x	x	x	x
-3d	x	x	x	x	x
Parto	x	x	x	x	x
+1d	x	x	x	x	x
+2d	x	x	x	x	x
+7d	x	x	x	x	x
+14d	x	x	x	x	x
+21d	x	x	x	x	x
+28d	x	x	x	x	x

Tabla 12: Diseño de la recogida de muestras.

4.3.1. GASOMETRÍA, SEROLOGÍA, HEMATOLOGÍA, MEDICIÓN DE HORMONAS Y RECOGIDA DE ORINA.

MUESTRAS DE SANGRE.

La sangre fue extraída en triple muestra de la vena yugular:

- * La primera utilizando jeringuillas previamente heparinizadas (heparina de litio balanceada con calcio 80 UI, Preset™, BD Diagnostics, Plymouth, Reino Unido) e intentamos evitar en todo momento la formación de burbujas de aire. Después de la extracción, sellamos las jeringuillas inmediatamente para evitar el intercambio con el medio externo, de forma inmediata procedimos a su análisis en el gasómetro.
- * A la segunda con la ayuda de un “vacutainer” y mediante tubos al vacío (Venoject®, Terumo, Bélgica). El suero se obtuvo después de permanecer 30 minutos en reposo y tras la centrifugación a 3.000 rpm (1.520 g) durante 10 minutos. Seguidamente, depositamos varias alícuotas de 1 cm³ de suero en tubos Eppendorf, que se mantuvieron almacenados a una temperatura entre -20 y -30°C hasta el momento de realizar las diferentes pruebas.
- * La tercera muestra se destinó para la obtención del plasma, la sangre heparinizada se conservó a 4°C hasta su posterior centrifugación en el laboratorio, la cual se realizó a 3.000 rpm (1.520 g) y a 4°C durante 20 minutos. Posteriormente, como en el caso del suero, guardamos una alícuota de 1 cm³ de plasma en tubos Eppendorf, que se identificaron debidamente y se mantuvieron almacenados a una temperatura entre -20 y -30°C hasta el momento de realizar las diferentes determinaciones laboratoriales.

MUESTRAS DE ORINA.

La recogida de orina se realizó mediante cateterismo vesical empleando una sonda comercial adecuada para vacas o por micción espontánea, recogiendo en ambos casos la orina en un recipiente comercial aséptico. Inmediatamente después se realizó el análisis de orina rutinario mediante tira reactiva y pHmetro empleando los reactivos métodos y equipos que se detallaran en el apartado correspondiente.

4.4. PARÁMETROS MEDIDOS Y METODOLOGÍA EMPLEADA.

4.4.1. PARÁMETROS PARA VALORAR EL ESTADO ÁCIDO-BÁSICO SANGUÍNEO.

Los niveles de pH, presión parcial de anhídrido carbónico ($p\text{CO}_2$) y bicarbonato (HCO_3^-) fueron medidos empleando el analizador portátil i-STAT[®] (Sensor Devices, Waukesha, EEUU). La efectividad y precisión de este equipo ha sido evaluada de forma positiva para su aplicación en medicina veterinaria (Figueiredo *et al.*, 2006)

El sistema i-STAT[®] está constituido por un analizador portátil y diferentes sensores que están incluidos en cartuchos, junto a componentes microfluídicos y la solución de calibrado correspondiente. De los múltiples cartuchos disponibles en el mercado, para nuestro trabajo seleccionamos el i-STAT^{EG8}[®] que dispone de los elementos necesarios para la cuantificación de todos los parámetros citados anteriormente en sangre entera heparinizada. Además, este cartucho mide las concentraciones de sodio (Na^+), potasio (K^+) y calcio iónico (Ca^{2+}).

Previamente a la realización del análisis de cada muestra, se corrigió la temperatura en la memoria del equipo de los 37°C, a la que está estandarizado, a la temperatura rectal de cada animal, con el propósito de corregir los valores de las presiones parciales de los gases.

4.4.1.1 PARÁMETROS MEDIDOS (pH, $p\text{CO}_2$).

El analizador midió los niveles de estos dos parámetros por potenciometría directa. El principio de esta técnica se basa en la cuantificación de la diferencia de potencial en un circuito entre un electrodo de medida y uno de referencia. El sistema de medida es calibrado con la introducción de una solución con niveles conocidos de cada parámetro. En el cartucho, utilizado en nuestro estudio, dicha solución tenía un pH de 7,43 y una $p\text{CO}_2$ de 30 mmHg.

4.4.1.2. PARÁMETROS CALCULADOS (HCO_3^-).

A partir de los valores del pH y $p\text{CO}_2$, el analizador calcula la concentración de bicarbonato empleando la siguiente ecuación:

$$\log \text{HCO}_3^- = \text{pH} + \log p\text{CO}_2 - 7,608$$

4.4.2. PARÁMETROS MEDIDOS Y METODOLOGÍA EMPLEADA PARA VALORAR EL ESTADO ÁCIDO-BÁSICO EN ORINA.

4.4.2.1. PH URINARIO.

El pH urinario se midió inmediatamente tras la extracción de orina mediante el empleo de un pHmetro (micropH 2001, Crison[®], Barcelona, España), las calibraciones del mismo se hicieron siguiendo rigurosamente las recomendaciones del fabricante. El valor de pH empleado en nuestro estudio fue la media aritmética de tres mediciones consecutivas. Con la misma muestra también se midió el pH utilizando una tira de orina (Combur-Test[®], Roche Diagnostics, Suiza) que es el método que está más accesible en las condiciones de campo.

4.4.3. MINERALES E IONES SANGUÍNEOS ESTUDIADOS.

4.4.3.1. SODIO, POTASIO Y CALCIO IÓNICO.

Las concentraciones sanguíneas de estos tres electrolitos se midieron por potenciometría iónica selectiva en sangre venosa. Para ello, de nuevo se seleccionó el sistema i-STAT[®] (Sensor Devices, Waukesha, EEUU) y el cartucho i-STAT^{EG8+} (Sensor Devices, Waukesha, EEUU). Al igual que para la determinación de pH y pCO₂, el principio de esta técnica se basa en la cuantificación de la diferencia de potencial en un circuito, entre un electrodo de medida y otro de referencia generada al interactuar el electrolito con su electrodo específico. En este caso, la solución de calibrado contenía 140 mEq/L de sodio, 4 mEq/L de potasio y 5 mg/dl de calcio iónico. El equipo aplica la ecuación de Nerntz para relacionar el potencial generado por el electrolito con su concentración. El empleo del análisis de muestras no diluidas (métodos directos) es un método seguro y preciso para determinar la concentración de iones libres (Durst y Siggard-Anderson, 1994).

4.4.3.2. CLORO, CALCIO TOTAL, FÓSFORO Y MAGNESIO.

Para el análisis de la concentración plasmática de estas muestras se empleó un analizador automático de bioquímica líquida Falcor 350[®] (Biotechnica Instruments spA, Roma, Italia).

La determinación de la concentración de iones cloruro se realizó mediante una técnica de colorimetría basada en la reacción del cloro de la muestra con una solución que contiene tiocianato mercuríco (Falcorgent Cloruro[®], A. Menarini diagnostics, Florencia, Italia).

Para evaluar el calcio total en las muestras se empleó un test colorimétrico basado en el uso de cresolfaleína coplexona (CPC) (Falcorgent Calcium CPC[®], A. Menarini diagnostics, Florencia, Italia).

El fósforo inorgánico se analizó mediante un test colorimétrico en presencia de amonio molibdato y en un medio ácido (Falcorgent Phosphorus[®], A. Menarini diagnostics, Florencia, Italia).

La concentración de iones de magnesio se realizó mediante una técnica de colorimetría basada en la reacción del magnesio de la muestra con una solución que contiene con azul de xilidil en solución alcalina (Falcorgent Magnesium[®], A. Menarini Diagnostics, Florencia, Italia).

4.4.4. OTROS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS: PROTEÍNAS TOTALES, ALBÚMINA, UREA Y CREATININA.

4.4.4.1. PROTEÍNAS TOTALES.

El método más sencillo, y no por eso menos fiable, para el análisis de las proteínas totales en suero es mediante un refractómetro. En nuestro caso empleamos el Protein/Urine Refractometer General tools[®] (General Tools & Instruments Co Lic. New Yor City EEUU). El utilizado por nosotros nos permitió una rápida lectura de la concentración de proteínas totales en el suero expresada en gr/dl con una precisión de 0,2 gr/dl.

4.4.4.2. ALBÚMINA.

La concentración de albúmina se determinó a partir de plasma. El método de determinación se basa en que la albúmina plasmática se combina con verde de bromocresol para formar un complejo de color que se mide a 620 nm. La absorbancia a 620 nm es directamente proporcional a la concentración de albúmina en la muestra.

Para desarrollar esta técnica empleamos el analizador automático de bioquímica líquida Falcor 350[®] (Biotechnica Instruments spA, Roma, Italia). El reactivo empleado para la realización de esta técnica fue el Falcorgent Albumin[®] (A. Menarini Diagnostics, Florencia, Italia).

4.4.4.3. GLOBULINAS.

La concentración plasmática de las globulinas fue calculada como la diferencia entre la concentración plasmática de las proteínas totales y la concentración de la albúmina.

4.4.5. ANÁLISIS DE HORMONAS (PTH, LEPTINA E INSULINA).

4.4.5.1. PTH.

Siguiendo las directrices de Endres y Rude (1994), hemos seleccionado un test para establecer las concentraciones de PTH intacta, ya que su medición presenta una mayor especificidad y sensibilidad que otras determinaciones que valoran regiones específicas de esta hormona (Ej. C-terminal, N-terminal, región central, etc.)

Para el análisis de la PTH, hemos utilizado una muestra de suero, conservada en las condiciones adecuadas y un ensayo secuencial inmunométrico quimioluminiscente en fase sólida (IMMULITE/ IMMULITE 1000 PTH intacta[®], Siemens, Diagnostic Products Corporation, California, EEUU). La sensibilidad fue de 3,0 pg/ml (0,3 pmol/L). Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron de 6,3% y de 7,9% respectivamente.

4.4.5.2. LEPTINA.

La concentración plasmática de leptina se midió utilizando un kit de radioinmunoanálisis (RIA) (Multispecies Leptin RIA kit[®]; Linco Research, St Louis, MO, EEUU). Como afirmaron Delavaud *et al.* (2002) este kit comercial RIA multiespecies, a pesar de algunas limitaciones, principalmente porque presenta una baja sensibilidad al anticuerpo en el menor rango de los valores de leptina, es tan efectivo y exacto en la determinación de los perfiles de leptina en la especie bovina como un RIA específico de rumiantes.

La sensibilidad del ensayo fue de $0,37 \pm 0,01$ ng/ml. Los coeficientes de variación de intra e inter-ensayo fueron de 4,2 y 8%, respectivamente. El paralelismo con las curvas estándar y con la dilución escalar del plasma bovino utilizadas para todos los ensayos no mostraron ninguna diferencia significativa (Accorsi *et al.*, 2005).

4.4.5.3. INSULINA.

El análisis de la insulina se llevó a cabo, a partir del reactivo Coat-a-Count Insulin[®] (Diagnostic Products Corporation, California, EEUU)", basado en un radioinmunoanálisis

(RIA) de fase sólida. Este "kit" de radioinmunoensayo, en el caso del bovino, ofrece un rango de referencia de $7,0-20^{14}$ $\mu\text{IU/mL}$. La sensibilidad fue de $1,2$ $\mu\text{IU/mL}$. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron de $5,1\%$ y de $7,1\%$, respectivamente.

4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.

El tratamiento estadístico de los resultados se realizó mediante el programa estadístico SPSS 18.0 para Windows con licencia para la Universidad de Santiago de Compostela.

Con el estudio estadístico tratamos acreditar la eficacia de la adición de sales aniónicas en la dieta para incrementar la calcemia en los momentos peripartales, comprobando el tiempo mínimo preciso de ingesta para que se produzca la reacción efectiva del organismo sobre la homeostasis cálcica y observar, además, las variaciones de los otros parámetros relacionados con la variación de las concentraciones séricas de calcio. Por otra parte, queremos comprobar la eficacia del valor predictivo de algunos parámetros sobre del estado ácido-básico y la calcemia.

En primer lugar determinamos los estadísticos descriptivos (media, desviación típica, máximo y mínimo), para cada grupo de estudio y para cada día de muestreo. Posteriormente, analizamos la existencia o no de diferencias estadísticamente significativas entre los valores de los diferentes parámetros estudiados en el grupo de vacas que consumen dieta aniónica y las que consumen dieta control, con especial atención al momento en que se observen las diferencias respecto al inicio del consumo de las sales aniónicas y del parto, mediante la prueba t de Student para muestras independientes, después de comprobar que la variable posee una distribución normal y de realizar la prueba de Levene de igualdad de varianzas.

Realizamos, también, un análisis de correlación bivariada para establecer la comparación y eficacia práctica de las medidas del pH urinario en el campo mediante tira reactiva múltiple y mediante pHmetro. También estudiamos la existencia de correlaciones bivariadas entre el pH urinario el pH en sangre, pCO_2 , HCO_3^- , calcio y calcio iónico, pues sería muy interesante poder contar con un análisis sencillo, rápido y económico como es la determinación del pH urinario para seguir la evolución de la calcemia.

Resultados

5. RESULTADOS.

Los resultados obtenidos en la presente memoria de tesis doctoral los presentamos en este apartado, ordenados y esquematizados en forma de tablas, donde recogemos los valores medios, desviación típica y los valores máximos y mínimos de los parámetros analizados. También hemos querido representar de forma gráfica, para facilitar su consulta e interpretación posterior, la evolución de las concentraciones de estos parámetros, desde el día 21 de parto hasta el 28 postparto, para cada uno de los grupos de animales. Además, con el fin de facilitar su comprensión los hemos organizado en los siguientes subapartados:

5.1. Efectos de la dieta en el estado ácido-base.

5.2. Efectos de la dieta en los minerales séricos y la PTH.

5.3. Efecto de la dieta en otros parámetros séricos de interés.

Tal como explicamos en el capítulo de material y métodos, debido a la dificultad de predecir con exactitud el día del parto y para facilitar el análisis estadístico de los datos, las muestras de sangre recogidas durante el periodo del parto se agruparon, en razón del momento del parto en los días -3, -5, -10 -12, -14, -17 y -21 pudiendo presentar variaciones de +/- 24 horas. Los animales que llevaban más de 22 días consumiendo la dieta aniónica y aquellos que adelantaron su parto respecto a la fecha inicialmente prevista fueron eliminados del estudio.

5.1. EFECTOS DE LA DIETA EN EL ESTADO ÁCIDO-BASE.

En las tablas desde la 13 a la 20 evaluamos los principales parámetros sanguíneos empleados para el análisis tradicional del equilibrio ácido-base (pH, bicarbonato y pCO_2) y el pH urinario. También se incluyen gráficas que muestran la evolución en el tiempo de estos parámetros a lo largo del periodo de estudio (gráficas 1 a 4).

El primer aspecto a destacar es la rápida respuesta del organismo a la adición de las sales aniónicas, que se puso de manifiesto en los primeros días de administración de la dieta. Así, tanto el pH en sangre venosa como el bicarbonato presentaron valores ligeramente inferiores en el grupo de animales alimentados con la dieta aniónica durante todo el parto. En el

Resultados

caso del pH en sangre venosa existe una tendencia hacia la significación estadística en el día -21 ($p=0,051$) y en día del parto (día 0, $p=0,066$) (gráfica 1), y por otra parte el bicarbonato presenta diferencias estadísticas en los días -21, -14 (gráfica 2). Aún durante el posparto, una vez unificada la ración, se mantiene esta tendencia durante la primera semana posparto en el caso del pH en sangre venosa, presentado el día 7 diferencias significativas. Con respecto a la concentración de bicarbonato en el posparto cabe destacar que en ambos grupos en el momento del parto y hasta el día dos se produce un descenso en dichos niveles. A partir del día 7 en ambos grupos se incrementa la concentración de bicarbonato, igualándose en el día 28. Para este parámetro observamos en el posparto diferencias estadísticas los días 7 y 14. En cuanto a la participación del componente respiratorio del equilibrio ácido-base (pCO_2), señalar que aunque la tendencia general a lo largo de todo el estudio es a encontrarnos valores ligeramente superiores en la dieta aniónica, el día -14 observamos significativamente un aumento en el grupo control. También el día 1 detectamos diferencias estadísticas pero en este caso el grupo aniónico presenta un valor más elevado (gráfica 3). Debemos señalar que todos los parámetros estudiados se mantuvieron siempre en todos los animales dentro de los rangos fisiológicos, aunque en algunas ocasiones mostrasen valores en el límite fisiológico.

Referente al pH urinario, observamos un marcado descenso en el grupo que ingirió las sales aniónicas. Así, mientras recibieron la dieta aniónica, el pH urinario se mantuvo significativamente más bajo que en el grupo control durante todo el período del preparto hasta el día -3 (gráfica 4). En cuanto se alimentan con la misma dieta, los valores del pH urinario, al cabo de unos pocos días tienden a igualarse y sólo detectamos diferencias significativas en los días 7 y 21. Cabe destacar que en ambos grupos se aprecia un descenso en el momento del parto.

Dentro de este trabajo, además, estudiamos la correlación entre el pH urinario medido con peachímetro y el medido con tira de orina, con el fin de proporcionar información sobre la eficacia de uno u otro método a la hora de realizar un control práctico en las ganaderías. En las tablas de correlación bilateral entre ambos y la gráfica correspondiente (tabla 21, gráfica 5), para los valores de pH urinario de este proyecto, observamos una fuerte correlación entre ambos métodos. También hay que destacar que observamos una fuerte correlación entre el pH urinario medido con peachímetro y tira de orina con el pH sanguíneo y calcio total (tabla 23). Sin embargo, con respecto al calcio iónico sólo observamos correlación con el pH

urinario medido con peachímetro. Por lo que para nuestro estudio los valores de pH urinario descritos serán los reflejados por el peachímetro.

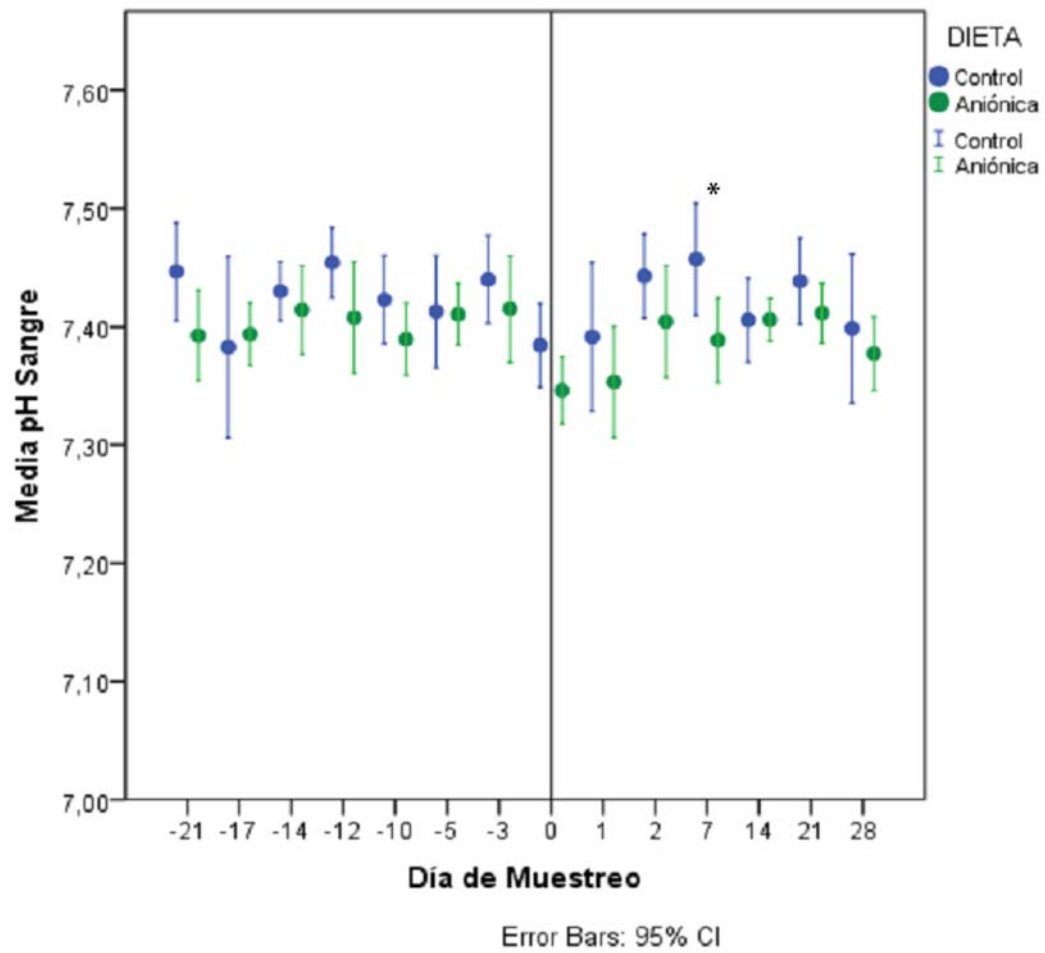
5.1.1. PH SANGRE.

pH sangre	Día de muestreo	N	Media	Desviación típica	Máximo	Mínimo	Dieta Control
	-21	7	7,44	0,04	7,50	7,40	
-17	7	7,38	0,08	7,46	7,27		
-14	7	7,43	0,03	7,47	7,38		
-12	7	7,45	0,03	7,51	7,42		
-10	7	7,42	0,04	7,46	7,36		
-5	7	7,41	0,05	7,47	7,31		
-3	7	7,44	0,04	7,49	7,38		
Parto	7	7,38	0,04	7,45	7,34		
1	7	7,39	0,07	7,46	7,27		
2	7	7,44	0,04	7,49	7,38		
7	7	7,45	0,05	7,50	7,37		
14	7	7,41	0,04	7,48	7,36		
21	7	7,43	0,04	7,50	7,40		
28	7	7,39	0,07	7,50	7,34		
Valores medios	7	7,42	0,05	7,48	7,36		

Tabla 13: Valores del pH de la sangre en la dieta control según el día de muestreo.

pH sangre	Día de muestreo	N	Media	Desviación típica	Máximo	Mínimo	Dieta Aniónica
	-21	10	7,39	0,05	7,46	7,32	
-17	10	7,39	0,04	7,44	7,32		
-14	10	7,41	0,05	7,47	7,33		
-12	10	7,41	0,07	7,50	7,30		
-10	10	7,38	0,04	7,48	7,34		
-5	10	7,41	0,04	7,45	7,35		
-3	10	7,41	0,06	7,50	7,30		
Parto	10	7,35	0,04	7,43	7,31		
1	10	7,35	0,06	7,43	7,27		
2	10	7,40	0,07	7,48	7,27		
7	10	7,39	0,05	7,45	7,27		
14	10	7,41	0,03	7,45	7,37		
21	10	7,41	0,04	7,45	7,36		
28	10	7,38	0,04	7,45	7,31		
Valores medios	10	7,39	0,05	7,46	7,32		

Tabla 14: Valores del pH de la sangre en la dieta aniónica según el día de muestreo.



Gráfica 1: Representación del pH de la sangre respecto al tiempo para las dos dietas. Dieta control (●), dieta aniónica (●).
 (**) (p<0,01). (*) (p<0,05).

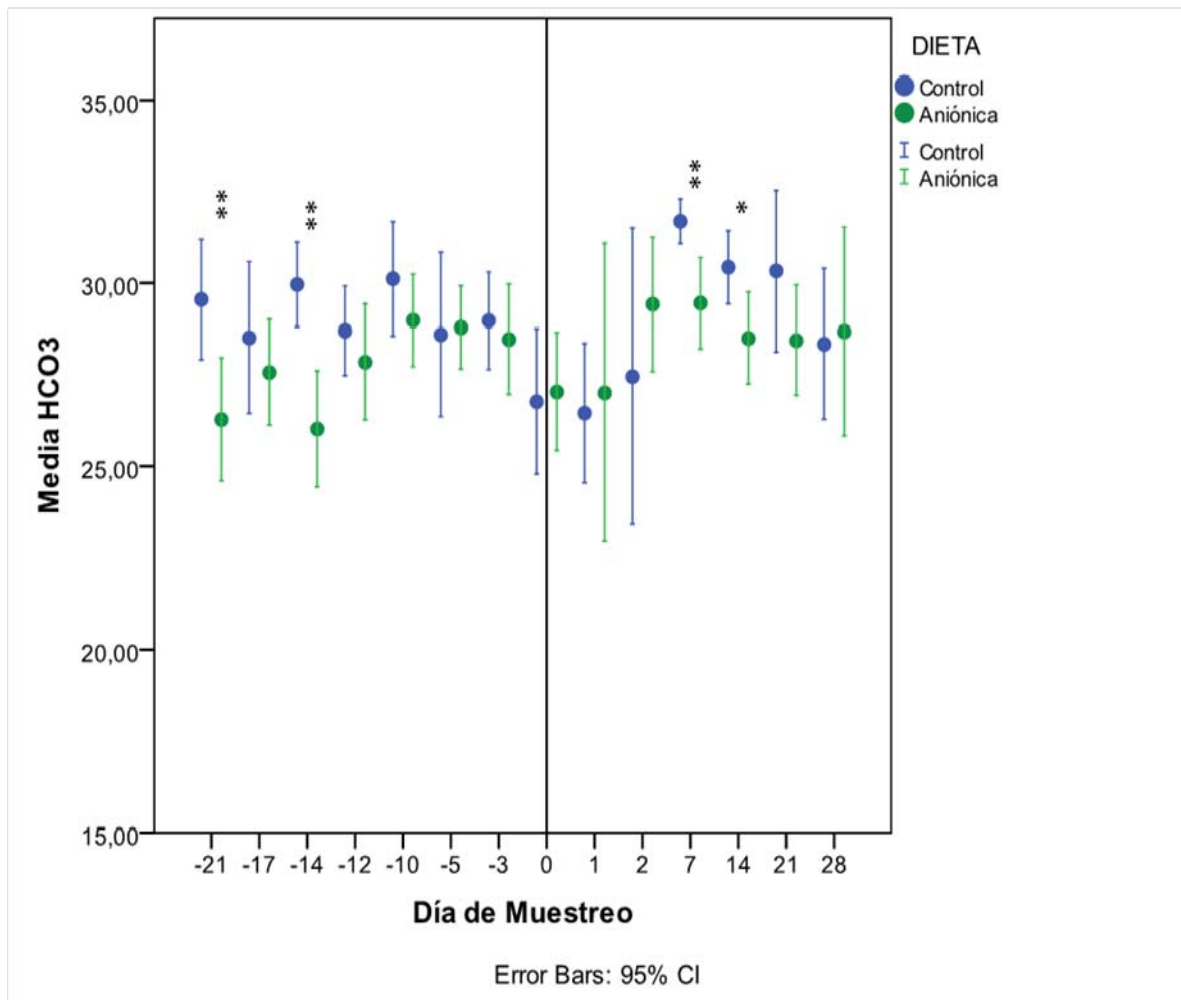
5.1.2. HCO_3^- .

HCO_3^- (mEq/L)	Día de muestreo	N	Media	Desviación típica	Máximo	Mínimo	Dieta Control
	-21	7	29,55	1,56	31,20	27,80	
-17	7	28,51	2,23	31,90	25,60		
-14	7	29,96	1,25	32,00	28,50		
-12	7	28,70	1,32	29,90	26,10		
-10	7	30,11	1,68	32,60	28,40		
-5	7	28,60	2,42	31,90	24,70		
-3	7	28,97	1,43	30,50	26,70		
Parto	7	26,77	2,15	30,60	23,70		
1	7	26,46	2,06	29,10	23,60		
2	7	27,46	4,38	31,30	19,00		
7	7	31,69	0,66	32,50	30,50		
14	7	30,43	1,08	32,00	29,00		
21	7	30,33	2,38	32,80	26,60		
28	7	28,34	2,22	31,20	25,10		
Valores medios	7	28,99	1,92	31,39	26,09		

Tabla 15: Valores del HCO_3^- en la dieta control según el día de muestreo.

HCO_3^- (mEq/L)	Día de muestreo	N	Media	Desviación típica	Máximo	Mínimo	Dieta Aniónica
	-21	10	26,28	2,35	30,70	22,60	
-17	10	27,57	2,02	31,50	25,30		
-14	10	26,02	3,07	21,30	28,10		
-12	10	27,85	2,21	30,60	23,60		
-10	10	28,98	1,76	32,00	25,50		
-5	10	28,79	1,58	30,80	26,50		
-3	10	28,47	2,09	32,00	24,10		
Parto	10	27,04	2,26	31,50	23,90		
1	10	27,01	4,87	32,80	17,00		
2	10	29,42	2,56	32,40	24,80		
7	10	29,45	1,74	31,50	26,80		
14	10	28,48	1,75	30,50	25,60		
21	10	28,44	2,09	30,60	23,50		
28	10	28,68	3,98	32,00	18,50		
Valores medios	10	28,03	2,45	30,73	23,99		

Tabla 16: Valores del HCO_3^- en la dieta aniónica según el día de muestreo.



Gráfica 2: Representación del HCO₃ (mEq/L) respecto al tiempo para las dos dietas. Dieta control (●), dieta aniónica (●). (**) (p<0,01). (*) (p<0,05).

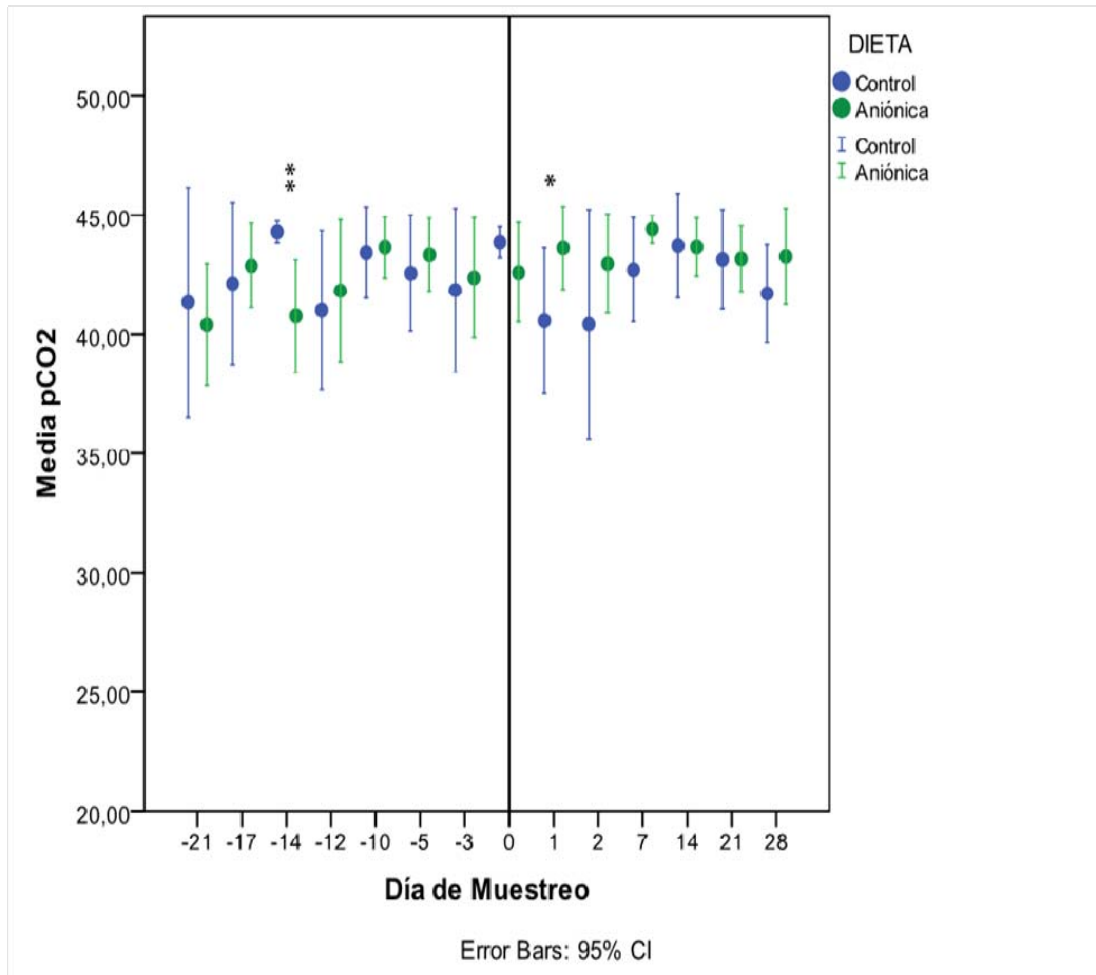
5.1.3. pCO₂.

pCO ₂ (mmHg)	Día de muestreo	N	Media	Desviación típica	Máximo	Mínimo	Dieta Control
	-21	7	41,33	4,59	45,00	34,00	
-17	7	42,14	3,67	45,00	36,00		
-14	7	44,29	0,49	45,00	44,00		
-12	7	41,00	3,61	44,00	35,00		
-10	7	43,43	2,07	45,00	40,00		
-5	7	42,57	2,64	45,00	37,00		
-3	7	41,86	3,72	45,00	35,00		
Parto	7	43,86	0,69	45,00	43,00		
1	7	40,57	3,31	44,00	36,00		
2	7	40,43	5,19	45,00	34,00		
7	7	42,71	2,36	45,00	40,00		
14	7	43,71	2,36	45,00	39,00		
21	7	43,14	2,27	45,00	39,00		
28	7	41,71	2,22	45,00	39,00		
Valores medios	7	42,34	2,80	44,86	37,93		

Tabla 17: Valores del pCO₂ en la dieta control según el día de muestreo.

pCO ₂ (mmHg)	Día de muestreo	N	Media	Desviación típica	Máximo	Mínimo	Dieta Aniónica
	-21	10	40,40	3,58	45,00	35,30	
-17	10	42,88	2,47	45,80	39,40		
-14	10	40,77	3,07	45,20	35,80		
-12	10	41,83	4,15	45,50	36,00		
-10	10	43,65	1,79	45,00	38,90		
-5	10	43,34	2,12	45,00	38,80		
-3	10	42,38	3,50	45,10	35,90		
Parto	10	42,60	2,91	45,60	38,00		
1	10	43,63	2,08	45,40	39,00		
2	10	42,97	2,90	45,00	35,80		
7	10	44,40	0,82	45,70	43,00		
14	10	43,66	1,69	45,40	39,80		
21	10	43,17	1,90	45,00	40,20		
28	10	43,27	2,82	45,00	36,30		
Valores medios	10	42,78	2,56	45,26	38,01		

Tabla 18: Valores del pCO₂ en la dieta aniónica según el día de muestreo.



Gráfica 3: Representación de la pCO₂ (mmHg) respecto al tiempo para las dos dietas. Dieta control (●), dieta aniónica (●). (**) (p<0,01). (*) (p<0,05).

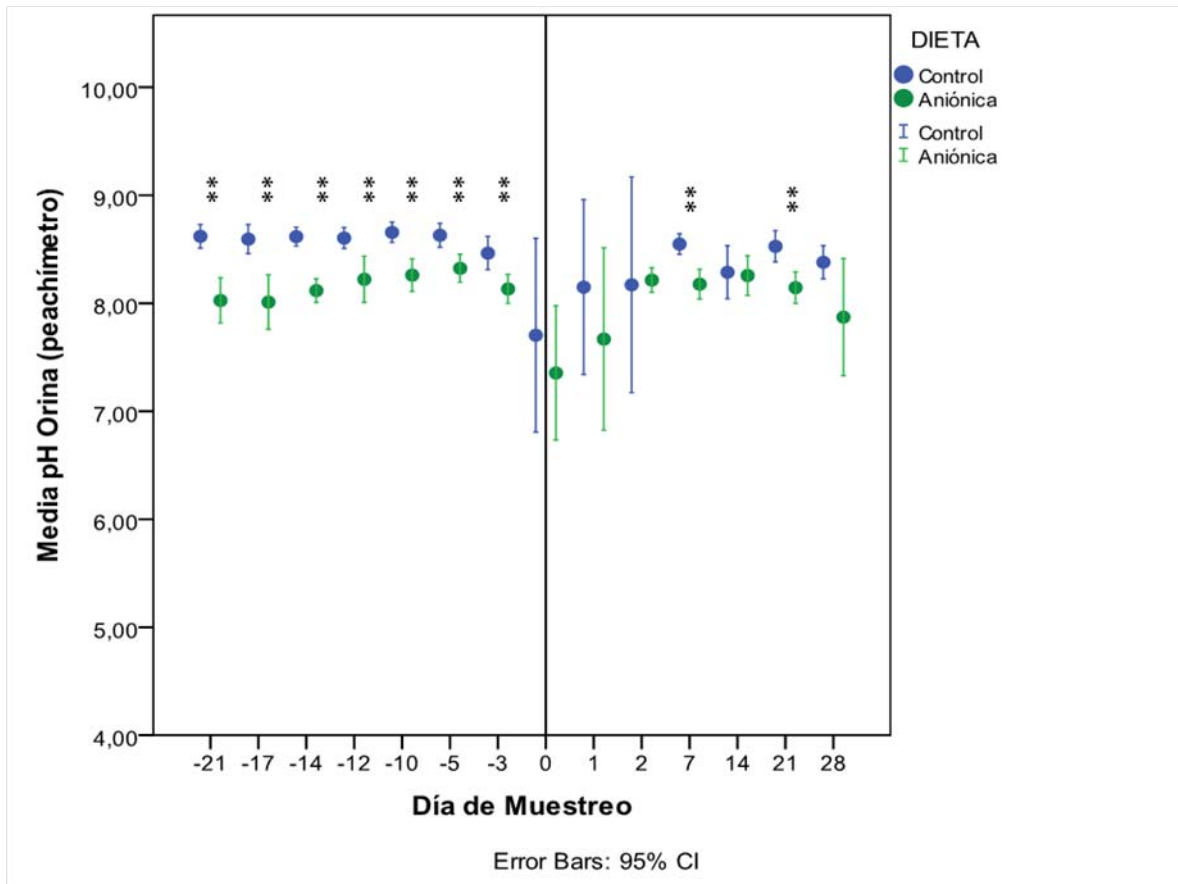
5.1.4. PH ORINA (PEACHÍMETRO).

pH Orina (peachímetro)	Día de muestreo	N	Media	Desviación típica	Máximo	Mínimo	Dieta Control
	-21	7	8,62	0,10	8,72	8,50	
-17	7	8,59	0,14	8,77	8,42		
-14	7	8,61	0,09	8,71	8,44		
-12	7	8,60	0,10	8,82	8,49		
-10	7	8,65	0,10	8,85	8,56		
-5	7	8,63	0,11	8,81	8,45		
-3	7	8,46	0,16	8,68	8,20		
Parto	7	7,70	0,61	8,30	6,52		
1	7	8,15	0,87	8,92	6,34		
2	7	8,17	1,08	8,76	5,75		
7	7	8,54	0,10	8,66	8,40		
14	7	8,28	0,26	8,57	7,77		
21	7	8,52	0,15	8,77	8,30		
28	7	8,38	0,16	8,53	8,07		
Valores medios		7	8,42	0,29	8,71	7,87	

Tabla 19: Valores del pH de la orina (peachímetro) en la dieta control según el día de muestreo.

pH Orina (peachímetro)	Día de muestreo	N	Media	Desviación típica	Máximo	Mínimo	Dieta Aniónica
	-21	10	8,02	0,29	8,51	7,65	
-17	10	8,01	0,35	8,45	7,37		
-14	10	8,11	0,14	8,40	7,93		
-12	10	8,22	0,29	8,58	7,53		
-10	10	8,26	0,20	8,65	7,84		
-5	10	8,32	0,18	8,69	8,08		
-3	10	8,13	0,18	8,32	7,75		
Parto	10	7,35	0,86	8,39	5,66		
1	10	7,66	0,84	8,30	5,66		
2	10	8,21	0,15	8,47	7,98		
7	10	8,17	0,19	8,42	7,77		
14	10	8,25	0,25	8,70	7,83		
21	10	8,14	0,20	8,39	7,79		
28	10	7,87	0,75	8,25	5,77		
Valores medios		10	8,05	0,35	8,47	7,33	

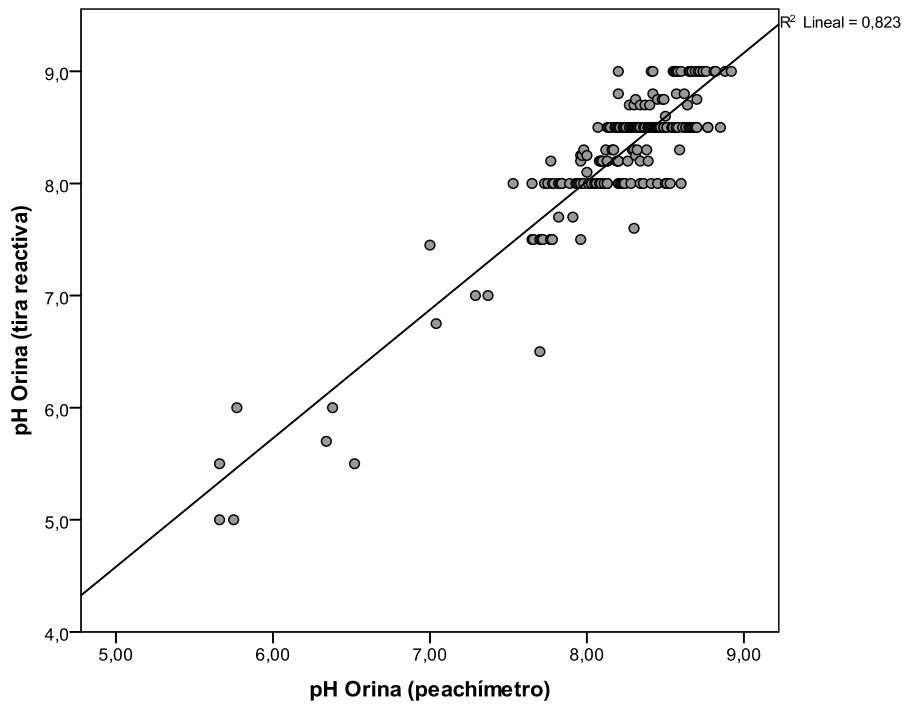
Tabla 20: Valores del pH de la orina (peachímetro) en la dieta aniónica según el día de muestreo.



Gráfica 4: Representación del pH de la orina respecto al tiempo para las dos dietas. Dieta control (●), dieta aniónica (●).
 (**) (p<0,01). (*) (p<0,05).

		pH Orina (tira reactiva)	pH Orina (peachímetro)
pH Orina (tira reactiva)	Correlación de Pearson	1	,945**
	Sig. (bilateral)		,000
pH Orina (peachímetro)	Correlación de Pearson	,945**	1
	Sig. (bilateral)	,000	

Tabla 21: Correlación bivariada entre resultados del pH en orina medidos mediante tira reactiva y medidos con peachímetro (N= 232).



Gráfica 5: Representación gráfica de la relación existente entre los valores de pH en orina medidos por tira reactiva y por peachímetro. Observar la relación lineal R^2 de 0,823.

		pH Orina (tira reactiva)	pH Orina (peachímetro)	pH Sangre	pCO ₂	HCO ₃ ⁻
pH Orina (tira reactiva)	Correlación de Pearson	1	,945**	,238**	,077	,232**
	Sig. (bilateral)		,000	,000	,245	,000
pH Orina (peachímetro)	Correlación de Pearson	,945**	1	,246**	,050	,202**
	Sig. (bilateral)	,000		,000	,448	,002
pH Sangre	Correlación de Pearson	,238**	,246**	1	-,380**	,168*
	Sig. (bilateral)	,000	,000		,000	,010
pCO₂	Correlación de Pearson	,077	,050	-,380**	1	,445**
	Sig. (bilateral)	,245	,448	,000		,000
HCO₃⁻	Correlación de Pearson	,232**	,202**	,168*	,445**	1
	Sig. (bilateral)	,000	,002	,010	,000	

Tabla 22: Correlaciones bivariadas entre pH de orina (medido con tira y peachímetro), pH en sangre, pCO₂ y HCO₃⁻. N = 232. ** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral). * La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

		pH Orina (tira reactiva)	pH Orina (peachímetro)	pH Sangre	Ca iónico mg/dL	Ca mg/dL
pH Orina (tira reactiva)	Correlación de Pearson	1	,907**	,329**	,104	,209**
	Sig. (bilateral)		,000	,000	,115	,001
pH Orina (peachímetro)	Correlación de Pearson	,907**	1	,381**	,145*	,217**
	Sig. (bilateral)	,000		,000	,028	,001
pH Sangre	Correlación de Pearson	,329**	,381**	1	,029	,065
	Sig. (bilateral)	,000	,000		,658	,326
Ca iónico mg/dL	Correlación de Pearson	,104	,145*	,029	1	,433**
	Sig. (bilateral)	,115	,028	,658		,000
Ca mg/dL	Correlación de Pearson	,209**	,217**	,065	,433**	1
	Sig. (bilateral)	,001	,001	,326	,000	

Tabla 23: Correlaciones bivariadas entre pH de orina (medido con tira y peachímetro), pH en sangre, calcio iónico y calcio sérico. N=232. ** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral). * La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

5.2. EFECTOS DE LA DIETA EN LOS MINERALES SÉRICOS Y LA PTH.

En este apartado agrupamos los datos referentes a los efectos de la administración de las sales aniónicas en los minerales séricos y la PTH, dividiéndolos en tres grupos:

1. Sodio, potasio y cloro.
2. Calcio, calcio iónico, fósforo y magnesio.
3. Paratohormona.

5.2.1. SODIO, POTASIO Y CLORO.

En el primer grupo de minerales séricos analizados observamos que a lo largo de todo nuestro estudio la concentración de sodio y de cloro fue casi siempre superior en el grupo control y en el caso del sodio apreciamos que existe una tendencia hacia la significación estadística en el día 7 ($p= 0,061$), pero en ningún caso han existido diferencias estadísticas para este mineral (gráfica 6). Con respecto al cloro detectamos que presenta significación estadística en los días -17, -10, -5, -3, 1, 2, 7, 21 y 28 (gráfica 8) Pero aún así, lo más destacable para ambos electrolitos es el descenso brusco en su concentración durante el posparto, tanto para el grupo aniónico como para el grupo control, alcanzando niveles inferiores a los del preparto.

En cuanto a la concentración de potasio, podemos comprobar que a excepción de dos días (-17 y +14), esta fue superior en el grupo de las vacas alimentadas con sales aniónicas, aunque sólo observamos diferencias estadísticamente significativas en los días 1, 7 y 28 entre ambos grupos (gráfica 7).

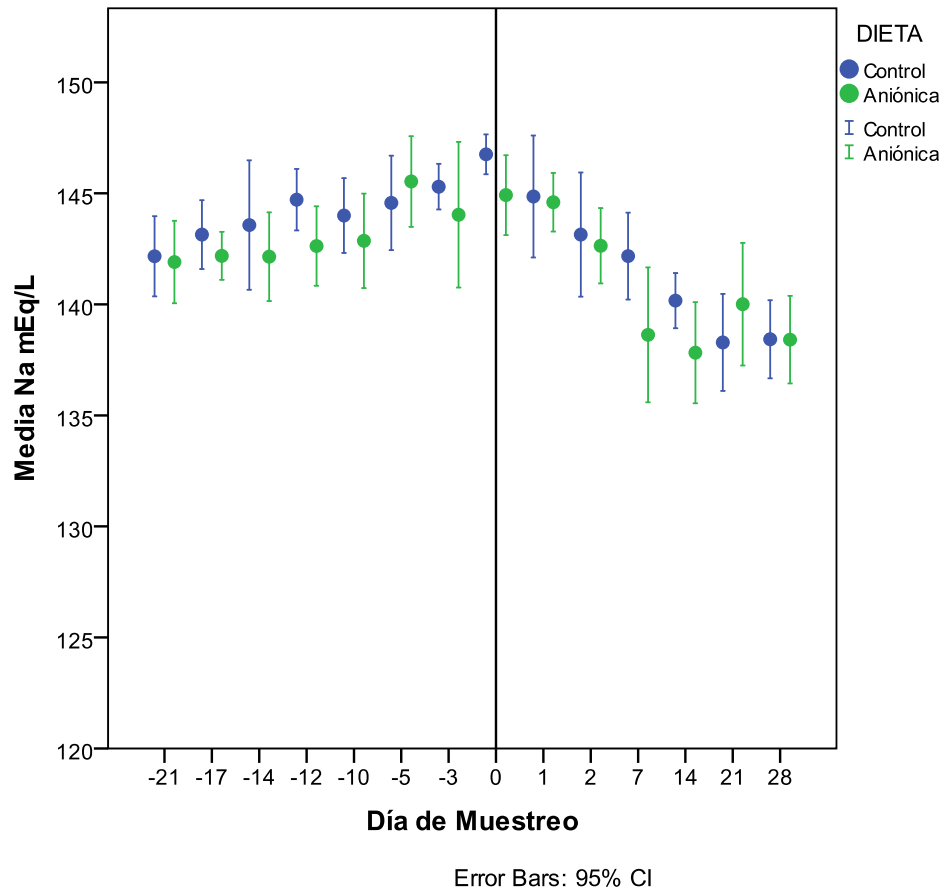
5.2.1.1. SODIO (Na⁺).

Sodio (mEq/L)	Día de muestreo	N	Media	Desviación típica	Máximo	Mínimo	Dieta Control
	-21	7	142,16	1,72	145,00	140,00	
-17	7	143,14	1,67	145,00	140,00		
-14	7	143,57	3,15	148,00	139,00		
-12	7	144,71	1,49	147,00	143,00		
-10	7	144,00	1,82	147,00	142,00		
-5	7	144,57	2,29	147,00	140,00		
-3	7	145,28	1,11	147,00	144,00		
Parto	7	146,75	0,97	148,00	146,00		
1	7	144,85	2,96	150,00	141,00		
2	7	143,14	3,02	146,00	139,00		
7	7	142,17	2,11	146,00	139,00		
14	7	140,17	1,34	142,00	139,00		
21	7	138,28	2,36	141,00	135,00		
28	7	138,42	1,90	142,00	137,00		
Valores medios	7	142,94	1,99	145,79	140,29		

Tabla 24: Valores del sodio (mEq/L) en la dieta control según el día de muestreo.

Sodio (mEq/L)	Día de muestreo	N	Media	Desviación típica	Máximo	Mínimo	Dieta Aniónica
	-21	10	141,90	2,59	144,50	136,20	
-17	10	142,18	1,50	145,30	140,32		
-14	10	142,14	2,60	146,80	139,08		
-12	10	142,62	2,50	146,20	140,09		
-10	10	142,86	2,97	146,70	137,40		
-5	10	145,53	2,85	150,60	140,80		
-3	10	144,03	4,58	150,30	132,42		
Parto	10	144,92	2,51	148,90	140,00		
1	10	144,60	1,57	146,40	141,20		
2	10	142,64	2,57	145,60	138,50		
7	10	138,62	4,24	143,80	128,88		
14	10	137,82	3,18	142,60	130,62		
21	10	140,00	3,85	146,10	135,40		
28	10	138,41	2,75	144,90	135,50		
Valores medios	10	142,02	2,88	146,34	136,89		

Tabla 25: Valores del sodio (mEq/L) en la dieta aniónica según el día de muestreo.



Gráfica 6: Representación del sodio (mEq/L) respecto al tiempo para las dos dietas. Dieta control (●), dieta aniónica (●).

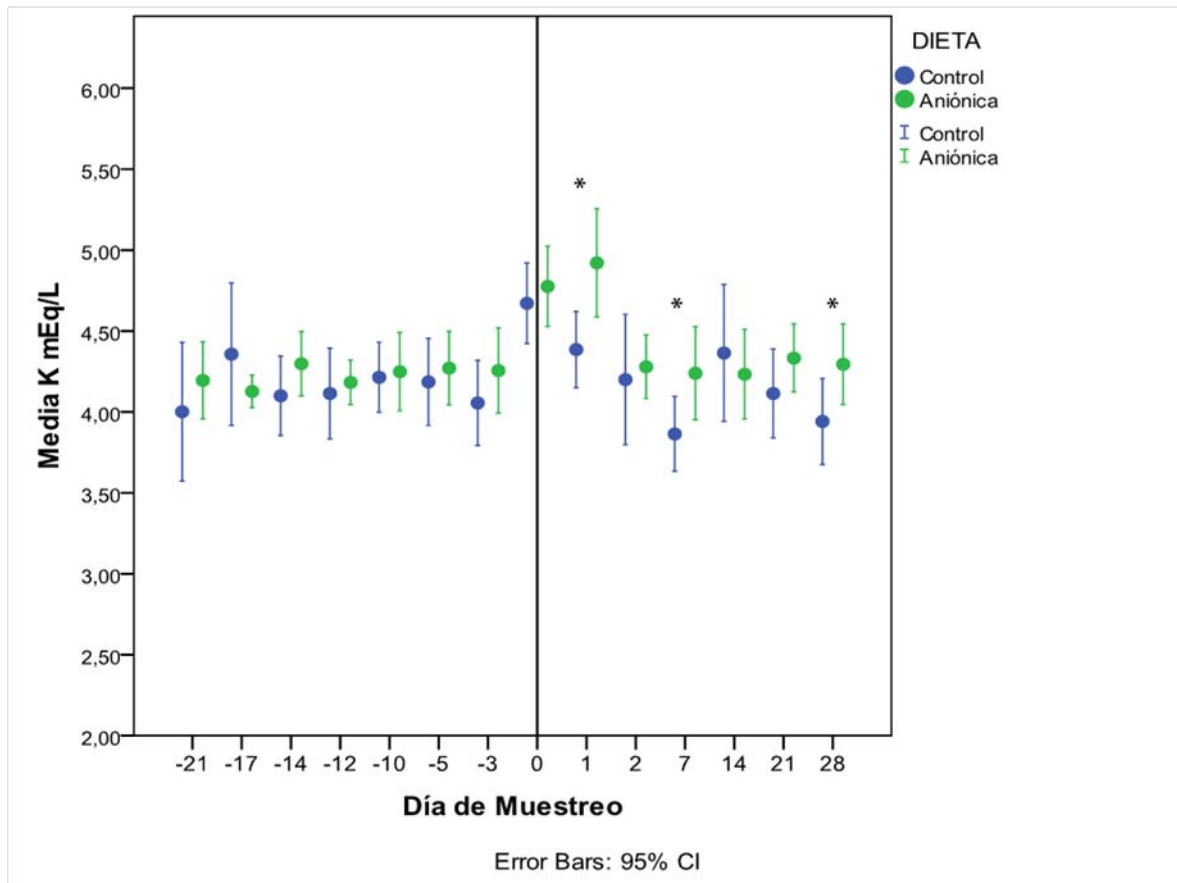
5.2.1.2. POTASIO (K⁺).

Potasio (mEq/L)	Día de muestreo	N	Media	Desviación típica	Máximo	Mínimo	Dieta Control
	-21	7	4,00	0,40	4,50	3,60	
-17	7	4,35	0,47	5,20	4,00		
-14	7	4,10	0,26	4,60	3,80		
-12	7	4,11	0,30	4,40	3,60		
-10	7	4,21	0,23	4,50	3,90		
-5	7	4,18	0,29	4,60	3,80		
-3	7	4,05	0,29	4,30	3,44		
Parto	7	4,67	0,26	4,90	4,20		
1	7	4,38	0,25	4,70	4,10		
2	7	4,20	0,43	4,90	3,50		
7	7	3,85	0,25	4,10	3,40		
14	7	4,36	0,45	5,20	3,90		
21	7	4,11	0,29	4,60	3,60		
28	7	3,94	0,28	4,30	3,55		
Valores medios	7	4,18	0,32	4,63	3,74		

Tabla 26: Valores del potasio (mEq/L) en la dieta control según el día de muestreo.

Potasio (mEq/L)	Día de muestreo	N	Media	Desviación típica	Máximo	Mínimo	Dieta Aniónica
	-21	10	4,19	0,33	4,85	3,82	
-17	10	4,12	0,14	4,28	3,80		
-14	10	4,29	0,25	4,60	3,89		
-12	10	4,18	0,19	4,44	3,90		
-10	10	4,24	0,33	5,16	3,89		
-5	10	4,27	0,31	4,76	3,81		
-3	10	4,25	0,36	5,05	3,68		
Parto	10	4,77	0,34	5,50	4,41		
1	10	4,92	0,39	5,61	4,34		
2	10	4,27	0,27	4,74	3,89		
7	10	4,23	0,40	4,94	3,67		
14	10	4,23	0,39	4,85	3,57		
21	10	4,33	0,29	4,79	3,89		
28	10	4,29	0,34	4,90	3,89		
Valores medios	10	4,33	0,31	4,89	3,89		

Tabla 27: Valores del potasio (mEq/L) en la dieta aniónica según el día de muestreo.



Gráfica 7: Representación del potasio (mEq/L) respecto al tiempo para las dos dietas. Dieta control (●), dieta aniónica (●).
 (**) (p<0,01). (*) (p<0,05).

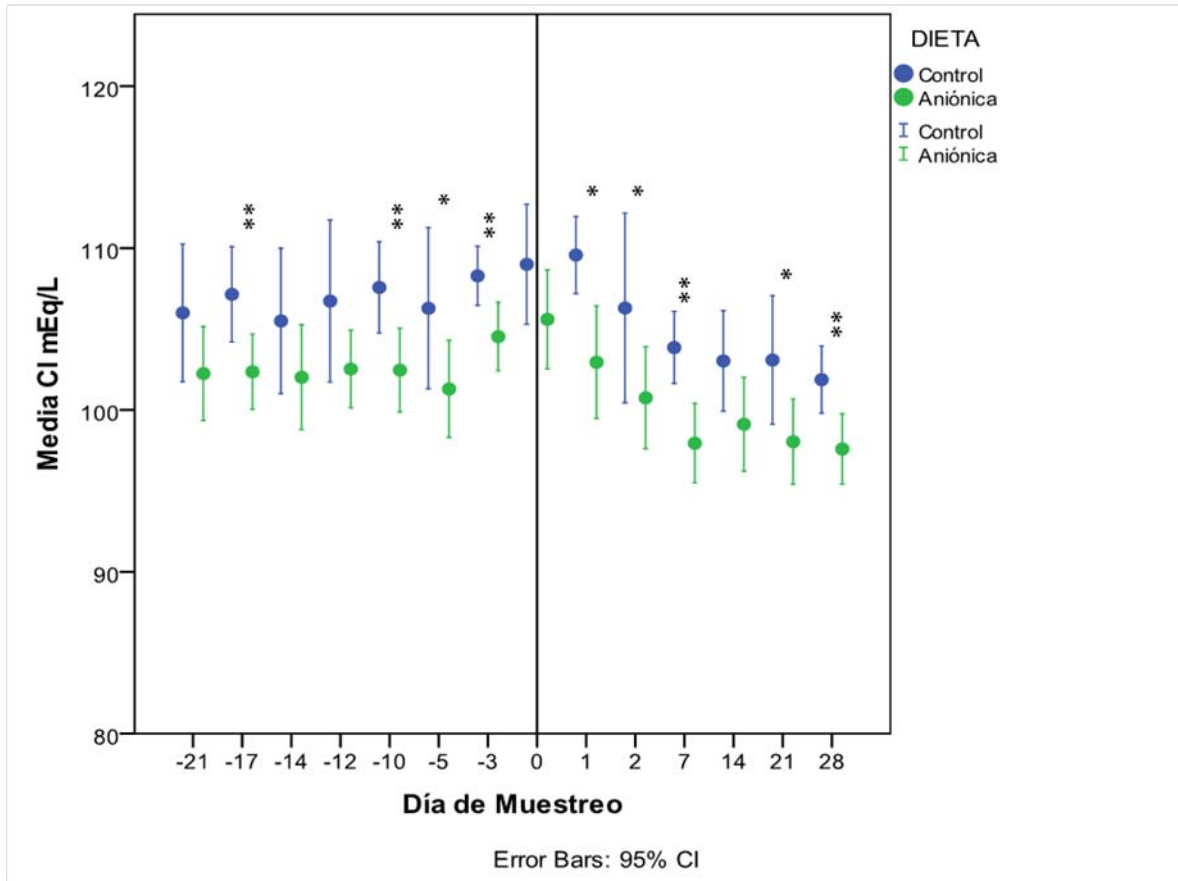
5.2.1.3. CLORO (CL⁻).

Cloro (mEq/L)	Día de muestreo	N	Media	Desviación típica	Máximo	Mínimo	Dieta Control
	-21	7	106,00	4,04	112,00	101,00	
-17	7	107,14	3,18	112,00	103,00		
-14	7	105,50	4,85	111,00	97,50		
-12	7	106,72	5,42	112,00	98,60		
-10	7	107,57	3,04	113,00	103,00		
-5	7	106,29	5,37	111,00	95,00		
-3	7	108,29	1,97	111,00	106,00		
Parto	7	109,00	4,00	114,00	102,00		
1	7	109,57	2,57	113,00	105,00		
2	7	106,30	6,33	113,00	98,30		
7	7	103,86	2,41	106,00	101,00		
14	7	103,02	3,35	107,00	97,20		
21	7	103,09	4,29	109,00	96,00		
28	7	101,87	2,24	106,00	99,10		
Valores medios	7	106,02	3,79	110,71	100,19		

Tabla 28: Valores del cloro (mEq/L) en la dieta control según el día de muestreo.

Cloro (mEq/L)	Día de muestreo	N	Media	Desviación típica	Máximo	Mínimo	Dieta Aniónica
	-21	10	102,25	4,05	109,00	95,60	
-17	10	102,36	3,25	109,00	97,90		
-14	10	102,02	4,21	108,00	94,30		
-12	10	102,53	3,36	108,00	98,60		
-10	10	102,46	3,61	107,00	96,00		
-5	10	101,30	4,19	109,00	95,90		
-3	10	104,53	2,94	109,00	98,80		
Parto	10	105,60	4,27	113,00	101,00		
1	10	102,95	4,15	111,00	97,00		
2	10	100,75	4,40	109,00	96,00		
7	10	97,95	3,42	105,00	94,00		
14	10	99,12	4,04	107,00	93,60		
21	10	98,04	3,68	104,00	94,00		
28	10	97,59	3,03	103,00	95,00		
Valores medios	10	101,39	3,76	107,93	96,26		

Tabla 29: Valores del cloro (mEq/L) en la dieta aniónica según el día de muestreo.



Gráfica 8: Representación del cloro (mEq/L) respecto al tiempo para las dos dietas. Dieta control (●), dieta aniónica (●).
 (**) (p<0,01). (*) (p<0,05).

5.2.2. CALCIO TOTAL, CALCIO IÓNICO, FÓSFORO, MAGNESIO Y PARATHORMONA.

Para valorar la homeostasis cálcica y sus variaciones, tanto a lo largo del periodo peripartal estudiado, como en función de las características de la ración suministrada, fijamos nuestra atención en los valores séricos del calcio, calcio iónico, fósforo, magnesio, y parathormona (tablas desde la 30 hasta la 39).

El comportamiento de la concentración sanguínea de calcio y calcio iónico a lo largo de todo el periodo experimental varió de manera semejante en ambos grupos. Así, durante el preparto y el parto, observamos una concentración más baja en la dieta aniónica y apreciamos con respecto a la concentración sanguínea de calcio diferencias estadísticamente significativas en los días -17, -14, -12 (gráfica 9) En el calcio iónico observamos que existen diferencias estadísticamente significativas en los días -17, -14, -12, -3 y el día del parto. Sin embargo, en uno de los momentos de mayor demanda de este mineral (24 y 48 horas postparto), se aprecia una mejoría en la calcemia del grupo aniónico con respecto al grupo control y, así, los niveles de calcio iónico son más elevados en el grupo que consumía la dieta aniónica (gráfica 10). Durante el resto del período experimental, la concentración de calcio de los animales que ingirieron sales aniónicas se mantuvo ligeramente elevada hasta el final del estudio y con respecto al calcio iónico la concentración fue semejante en ambos grupos. Así, sólo apreciamos para el calcio total diferencias estadísticamente significativas en el día 21 y para el calcio iónico en el día 28.

La concentración sanguínea de magnesio se mantuvo bastante estable a lo largo de todo el periodo experimental observándose pequeñas variaciones entre ambos grupos y en el día 21 fueron significativamente más altos en la dieta aniónica (gráfica 11). Sin embargo, debemos señalar la presencia de concentraciones más elevadas de esta mineral durante el periparto, en los animales del grupo que recibía dieta aniónica.

En nuestro trabajo la fosfatemia durante el preparto fue más elevada en la dieta aniónica con respecto a la dieta control hasta el día -5. A partir de ese día la concentración sanguínea de fósforo fue superior en el grupo control y, hasta prácticamente el final del estudio, la concentración en ambos grupos no procedió a igualarse. Cabe destacar que en ambos grupos se produjo una leve hipofosfatemia el día del parto y hasta el día 28 no se

recuperaron los valores normales. Sólo observamos diferencias estadísticamente significativas en el día -14 (gráfica 12).

Los niveles de paratohormona (gráfica 13) en ambos grupos se comportan de forma semejante hasta el día 1, aunque con valores superiores en el grupo aniónico, así apreciamos diferencias significativas en los días -21, -17, -10, -5 y -3. La concentración máxima, para ambos grupos, se obtuvo el día -17 y a partir de este día, hasta el día -10, los valores van decreciendo. Durante los días -10 y hasta el día 1 la concentración se mantiene prácticamente estable. En el posparto, la tendencia en ambos grupos es hacia valores similares; así, desde el día 2 hasta el día 14 la concentración en el grupo aniónico disminuye paulatinamente, mientras que en el grupo control se observa un ligero ascenso llegando a obtener valores superiores a los de la dieta aniónica en los días 14 y 21. En el día 28, la concentración de PTH es superior en el grupo aniónico que en el grupo control y observamos diferencias significativas, aunque los valores detectados no llegan a alcanzar a los del preparto ya que estos a lo largo de todo el estudio para ambos grupos siempre fueron superiores.

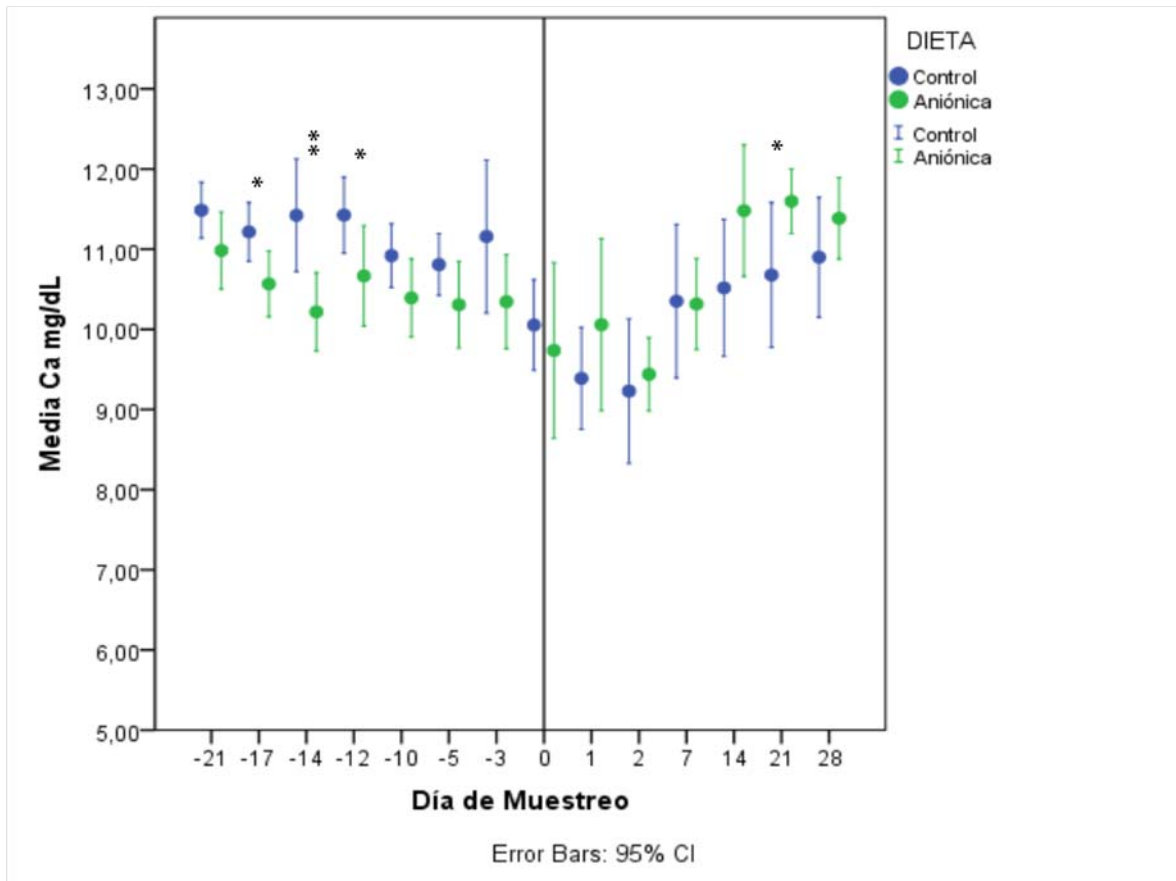
5.2.2.1. CALCIO TOTAL (CA).

Calcio sérico (mg/dl)	Día de muestreo	N	Media	Desviación típica	Máximo	Mínimo	Dieta Control
	-21	7	11,48	0,33	12,03	11,15	
-17	7	11,21	0,39	11,75	10,57		
-14	7	11,42	0,75	12,48	9,91		
-12	7	11,42	0,51	12,25	10,25		
-10	7	10,92	0,43	11,49	10,06		
-5	7	10,80	0,41	11,36	10,31		
-3	7	11,15	1,03	13,25	10,17		
Parto	7	10,05	0,61	10,80	9,20		
1	7	9,38	0,68	10,25	8,38		
2	7	9,22	0,97	10,95	8,19		
7	7	10,35	1,03	12,44	9,49		
14	7	10,51	0,92	12,16	9,18		
21	7	10,67	0,97	12,18	9,43		
28	7	10,90	0,80	12,52	9,89		
Valores medios	7	10,68	0,70	11,85	9,73		

Tabla 30: Valores del calcio sérico (mg/dl) en la dieta control según el día de muestreo.

Calcio sérico (mg/dl)	Día de muestreo	N	Media	Desviación típica	Máximo	Mínimo	Dieta Aniónica
	-21	10	10,98	0,67	11,61	9,43	
-17	10	10,56	0,57	11,37	9,50		
-14	10	10,21	0,63	11,25	9,15		
-12	10	10,66	0,87	11,55	9,17		
-10	10	10,39	0,68	11,31	9,13		
-5	10	10,31	0,75	11,18	9,03		
-3	10	10,34	0,82	11,32	8,68		
Parto	10	9,73	1,53	13,39	8,36		
1	10	10,05	1,28	11,85	8,22		
2	10	9,44	0,64	10,99	8,86		
7	10	10,31	0,79	11,67	9,27		
14	10	11,48	1,14	13,79	9,57		
21	10	11,59	0,56	12,14	10,15		
28	10	11,38	0,71	12,51	9,81		
Valores medios	10	10,53	0,83	11,85	9,17		

Tabla 31: Valores del calcio sérico (mg/dl) en la dieta aniónica según el día de muestreo.



Gráfica 9: Representación del calcio sérico (mg/dl) respecto al tiempo para las dos dietas. Dieta control (●), dieta aniónica (●). (**) (p<0,01). (*) (p<0,05).

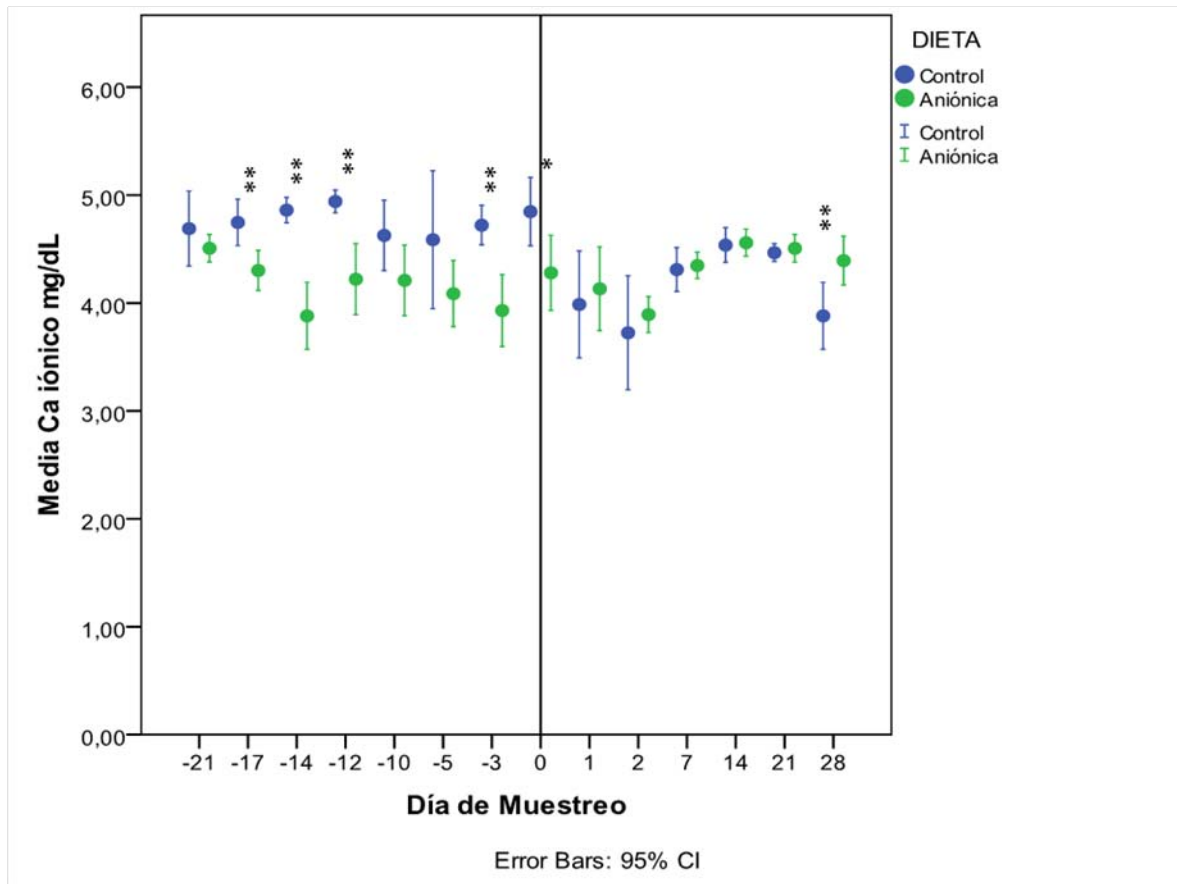
5.2.2.2. CALCIO IÓNICO (Ca²⁺).

Calcio iónico (mg/dl)	Día de muestreo	N	Media	Desviación típica	Máximo	Mínimo	Dieta Control
	-21	7	4,69	0,33	5,09	4,09	
-17	7	4,74	0,23	5,17	4,53		
-14	7	4,86	0,12	5,09	4,69		
-12	7	4,94	0,11	5,05	4,73		
-10	7	4,62	0,35	4,85	3,85		
-5	7	4,58	0,69	5,17	3,09		
-3	7	4,72	0,19	4,97	4,45		
Parto	7	4,84	0,34	5,25	4,25		
1	7	3,98	0,53	4,57	3,21		
2	7	3,72	0,57	4,49	2,85		
7	7	4,31	0,21	4,57	3,93		
14	7	4,53	0,17	4,85	4,29		
21	7	4,46	0,08	4,61	4,37		
28	7	3,88	0,33	4,29	3,53		
Valores medios	7	4,49	0,30	4,86	3,99		

Tabla 32: Valores del calcio iónico (mg/dl) en la dieta control según el día de muestreo.

Calcio iónico (mg/dl)	Día de muestreo	N	Media	Desviación típica	Máximo	Mínimo	Dieta Aniónica
	-21	10	4,50	0,17	4,72	4,11	
-17	10	4,30	0,26	4,49	3,81		
-14	10	3,88	0,40	4,42	3,52		
-12	10	4,22	0,45	4,66	3,52		
-10	10	4,21	0,45	4,86	3,63		
-5	10	4,08	0,42	4,56	3,60		
-3	10	3,93	0,46	4,66	3,14		
Parto	10	4,28	0,48	5,14	3,67		
1	10	4,13	0,46	5,14	3,58		
2	10	3,89	0,23	4,16	3,48		
7	10	4,34	0,17	4,64	4,08		
14	10	4,55	0,17	4,86	4,31		
21	10	4,50	0,17	4,80	4,27		
28	10	4,39	0,31	4,78	3,60		
Valores medios	10	4,23	0,33	4,71	3,74		

Tabla 33: Valores del calcio iónico (mg/dl) en la dieta aniónica según el día de muestreo.



Gráfica 10: Representación del calcio iónico (mg/dl) respecto al tiempo para las dos dietas. Dieta control (●), dieta aniónica (●). (**) ($p < 0,01$). (*) ($p < 0,05$).

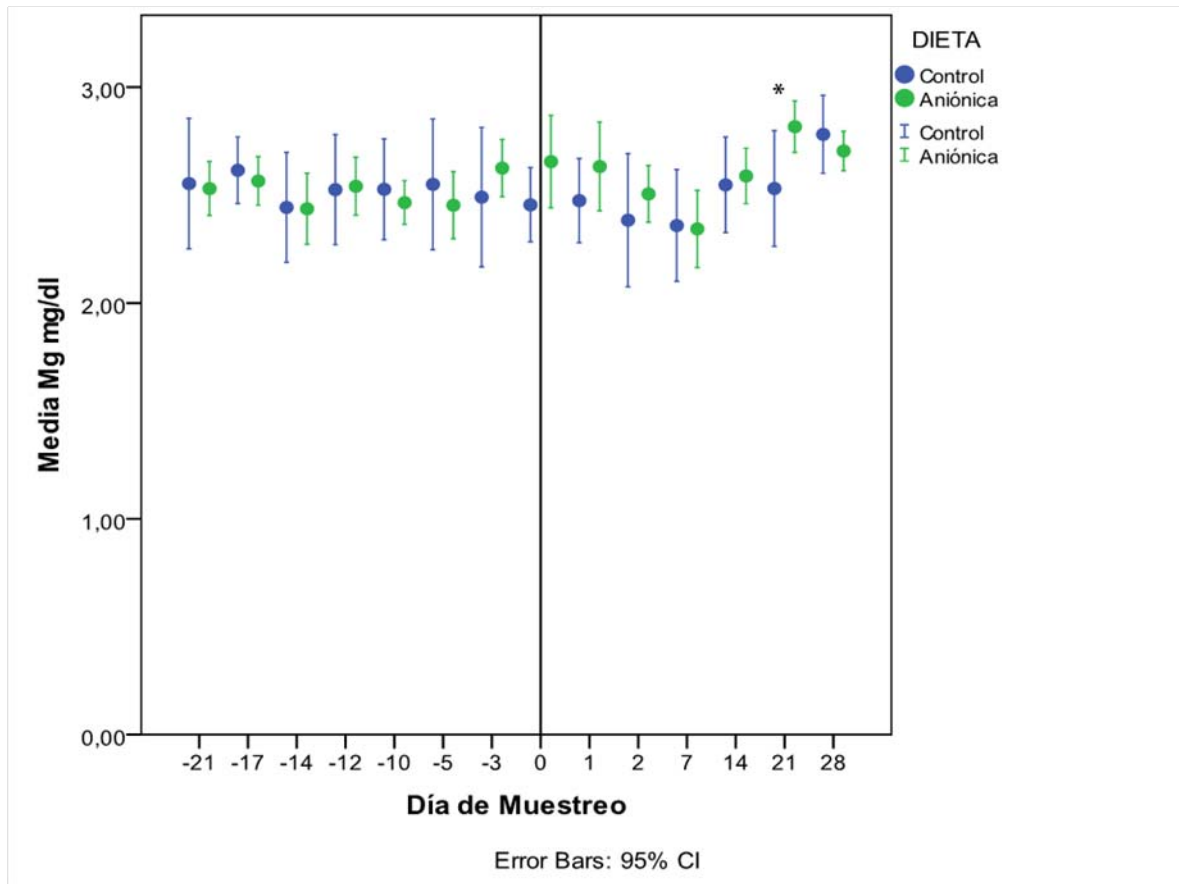
5.2.2.3. MAGNESIO (MG⁺²).

Magnesio (mg/dl)	Día de muestreo	N	Media	Desviación típica	Máximo	Mínimo	Dieta Control
	-21	7	2,55	0,28	2,82	2,13	
-17	7	2,61	0,16	2,86	2,38		
-14	7	2,44	0,27	2,85	2,09		
-12	7	2,52	0,27	2,81	2,03		
-10	7	2,52	0,25	3,00	2,18		
-5	7	2,55	0,32	3,10	2,09		
-3	7	2,49	0,34	3,21	2,11		
Parto	7	2,45	0,18	2,85	2,25		
1	7	2,47	0,21	2,79	2,16		
2	7	2,38	0,33	2,85	1,92		
7	7	2,35	0,27	2,66	1,84		
14	7	2,54	0,23	2,82	2,16		
21	7	2,53	0,28	2,92	2,16		
28	7	2,78	0,19	3,01	2,46		
Valores medios	7	2,51	0,26	2,90	2,14		

Tabla 34: Valores del magnesio (mg/dl) en la dieta control según el día de muestreo.

Magnesio (mg/dl)	Día de muestreo	N	Media	Desviación típica	Máximo	Mínimo	Dieta Aniónica
	-21	10	2,53	0,17	2,74	2,27	
-17	10	2,56	0,15	2,78	2,24		
-14	10	2,43	0,21	2,83	2,19		
-12	10	2,54	0,18	2,83	2,33		
-10	10	2,46	0,14	2,70	2,21		
-5	10	2,45	0,21	2,78	2,06		
-3	10	2,62	0,18	3,09	2,44		
Parto	10	2,65	0,29	3,15	2,26		
1	10	2,63	0,24	3,01	2,35		
2	10	2,50	0,18	2,81	2,28		
7	10	2,34	0,25	2,72	2,00		
14	10	2,58	0,17	3,02	2,38		
21	10	2,81	0,16	3,09	2,56		
28	10	2,70	0,12	2,92	2,40		
Valores medios	10	2,56	0,19	2,89	2,28		

Tabla 35: Valores del magnesio (mg/dl) en la dieta aniónica según el día de muestreo.



Gráfica 11: Representación del magnesio (mg/dl) respecto al tiempo para las dos dietas. Dieta control (●), dieta aniónica (●). (**) (p<0,01). (*) (p<0,05).

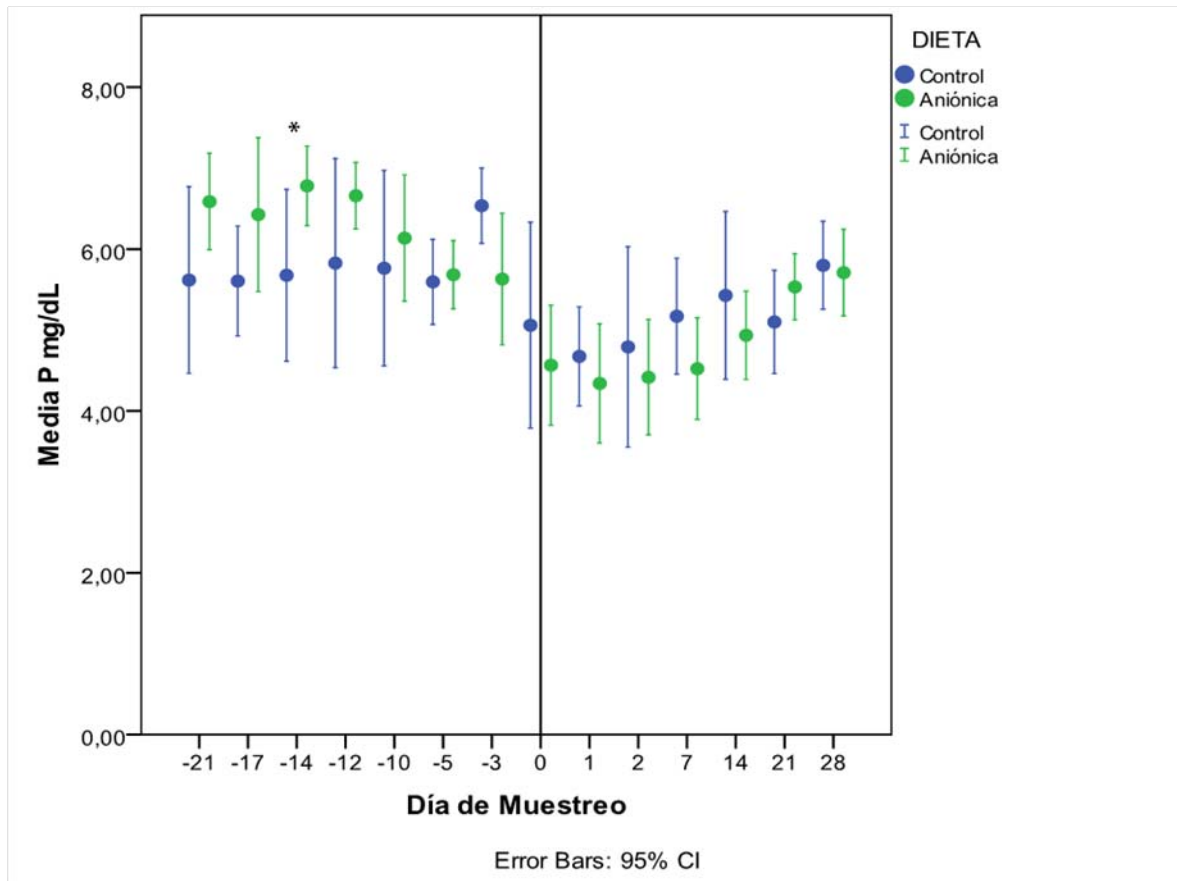
5.2.2.4. FÓSFORO (P).

Fósforo (mg/dl)	Día de muestreo	N	Media	Desviación típica	Máximo	Mínimo	Dieta Control
	-21	7	5,61	1,09	7,30	4,32	
-17	7	5,60	0,73	6,26	4,46		
-14	7	5,67	1,14	6,91	3,92		
-12	7	5,82	1,39	7,58	4,25		
-10	7	5,76	1,30	7,22	3,73		
-5	7	5,59	0,56	6,49	4,84		
-3	7	6,53	0,50	7,17	5,68		
Parto	7	5,05	1,37	6,65	3,37		
1	7	4,67	0,66	5,73	3,78		
2	7	4,79	1,33	7,21	3,32		
7	7	5,17	0,77	6,08	4,23		
14	7	5,42	1,12	6,67	3,76		
21	7	5,09	0,69	6,30	4,21		
28	7	5,79	0,58	6,58	5,08		
Valores medios		7	5,47	0,95	6,73	4,21	

Tabla 36: Valores del fósforo (mg/dl) en la dieta control según el día de muestreo.

Fósforo (mg/dl)	Día de muestreo	N	Media	Desviación típica	Máximo	Mínimo	Dieta Aniónica
	-21	10	6,58	0,83	7,60	4,92	
-17	10	6,62	1,32	7,50	3,41		
-14	10	6,78	0,63	7,61	5,88		
-12	10	6,65	0,57	7,62	5,84		
-10	10	6,13	1,08	7,11	3,31		
-5	10	5,68	0,59	6,34	4,63		
-3	10	5,63	1,13	7,54	3,33		
Parto	10	4,56	1,03	6,24	3,40		
1	10	4,34	0,88	5,85	3,26		
2	10	4,41	0,99	6,82	3,43		
7	10	4,52	0,87	5,97	3,38		
14	10	4,93	0,76	6,26	4,00		
21	10	5,53	0,52	6,59	4,95		
28	10	5,70	0,74	6,75	4,89		
Valores medios		10	5,58	0,85	6,84	4,19	

Tabla 37: Valores del fósforo (mg/dl) en la dieta aniónica según el día de muestreo.



Gráfica 12: Representación del fósforo (mg/dl) respecto al tiempo para las dos dietas. Dieta control (●), dieta aniónica (●).
 (**) (p<0,01). (*) (p<0,05).

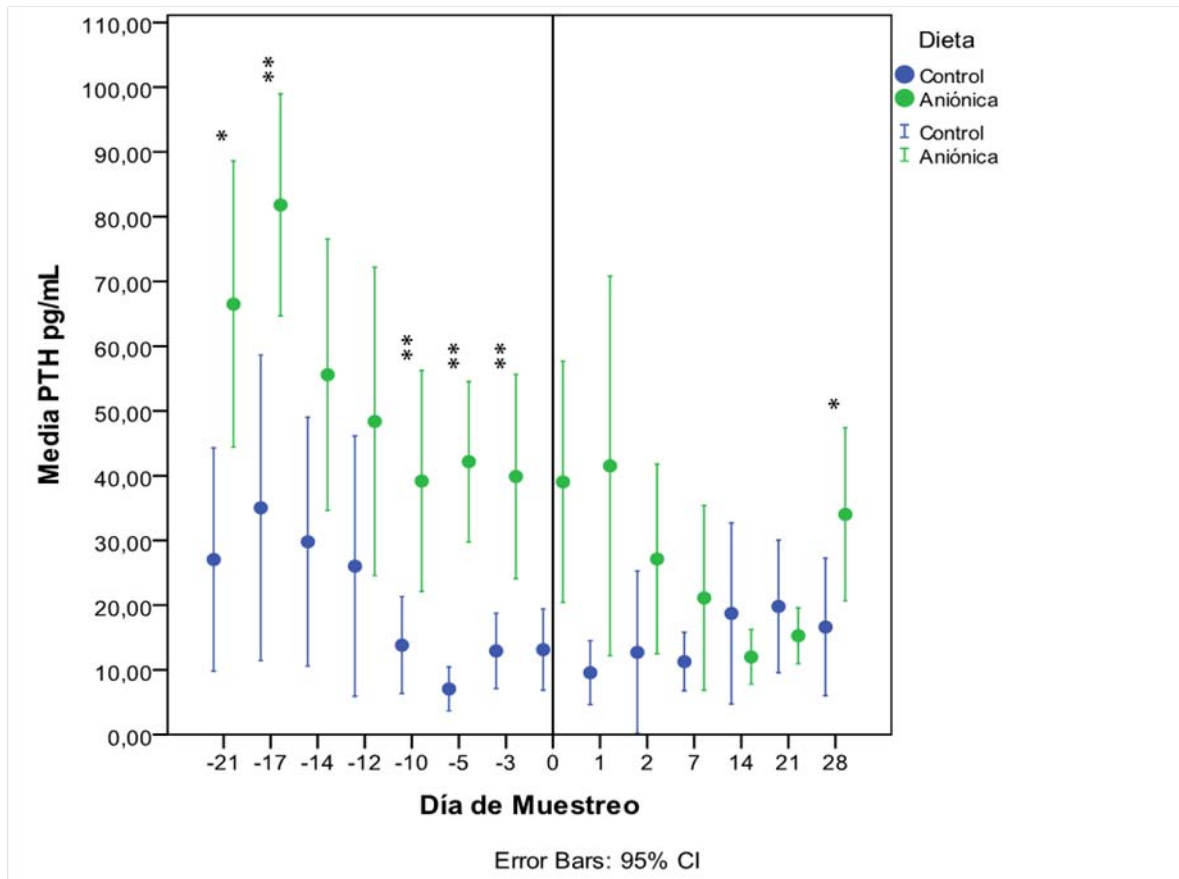
5.2.2.5. PARATOHORMONA (PTH).

Paratohormona (pg/ml)	Día de muestreo	N	Media	Desviación típica	Máximo	Mínimo	Dieta Control
	-21	7	27,05	16,43	46,80	6,00	
-17	7	35,04	25,52	74,70	3,40		
-14	7	29,80	20,77	70,10	5,70		
-12	7	26,02	21,73	60,20	3,30		
-10	7	13,82	8,09	29,60	3,00		
-5	7	7,07	3,66	13,80	3,30		
-3	7	12,94	6,30	22,30	7,00		
Parto	7	13,14	6,79	21,90	3,90		
1	7	9,58	5,32	19,40	3,50		
2	7	12,72	13,56	41,00	3,70		
7	7	11,28	4,89	19,80	3,70		
14	7	18,72	15,10	41,00	4,30		
21	7	19,81	11,06	40,20	6,20		
28	7	16,62	11,48	35,40	5,90		
Valores medios	7	18,12	12,19	38,30	4,49		

Tabla 38: Valores de la paratohormona (pg/ml) en la dieta control según el día de muestreo.

Paratohormona (pg/ml)	Día de muestreo	N	Media	Desviación típica	Máximo	Mínimo	Dieta Aniónica
	-21	10	66,50	30,88	109,00	9,60	
-17	10	81,82	23,95	119,00	44,70		
-14	10	55,60	27,27	86,50	16,20		
-12	10	48,39	33,28	112,00	18,20		
-10	10	39,18	23,88	73,80	11,40		
-5	10	42,17	17,31	71,60	13,40		
-3	10	39,88	22,06	70,20	7,20		
Parto	10	39,05	26,02	87,70	6,30		
1	10	41,52	35,06	87,70	3,60		
2	10	27,14	20,45	66,70	7,90		
7	10	21,12	19,93	66,70	3,50		
14	10	12,01	5,89	21,40	3,50		
21	10	15,29	6,04	23,20	6,90		
28	10	34,03	18,68	63,50	6,90		
Valores medios	10	40,26	22,19	75,64	11,38		

Tabla 39: Valores de la paratohormona (pg/ml) en la dieta aniónica según el día de muestreo.



Gráfica 13: Representación de la paratohormona (pg/ml) respecto al tiempo para las dos dietas. Dieta control (●), dieta aniónica (●). (**) (p<0,01). (*) (p<0,05).

5.3. EFECTO DE LA DIETA EN OTROS PARÁMETROS SÉRICOS DE INTERÉS.

Resulta interesante el comportamiento de otros parámetros para valorar adecuadamente tanto la respuesta orgánica como el comportamiento metabólico del organismo, ante la variación de los niveles de iones de la dieta y su repercusión en la homeostasis cálcica. Por este motivo, incluimos en nuestro estudio las proteínas totales, albúmina, globulinas, insulina y leptina (tablas desde 40 hasta la 49).

La concentración de proteínas y las globulinas (gráficas 14 y 16, respectivamente) se mantuvieron para ambas dietas en valores similares y sólo observamos diferencias significativas para las proteínas totales en el día -5. Por su parte la albúmina permaneció con valores superiores en el grupo control hasta el día 2 posparto alcanzando significación estadística en los días -12 y -10. A partir del día 7 el grupo aniónico obtuvo una mayor concentración (gráfica 15).

La concentración de insulina se mantuvo más elevada en el grupo que recibió la dieta aniónica hasta el día 2 posparto y observamos diferencias significativas entre ambos grupos en los días -10 y 2. El resto del período las concentraciones se mantuvieron iguales (gráfica 17).

Los valores de la concentración sanguínea de leptina se mantuvieron prácticamente iguales en ambos grupos y sólo detectamos diferencias estadísticamente significativas en el día 1 (gráfica18).

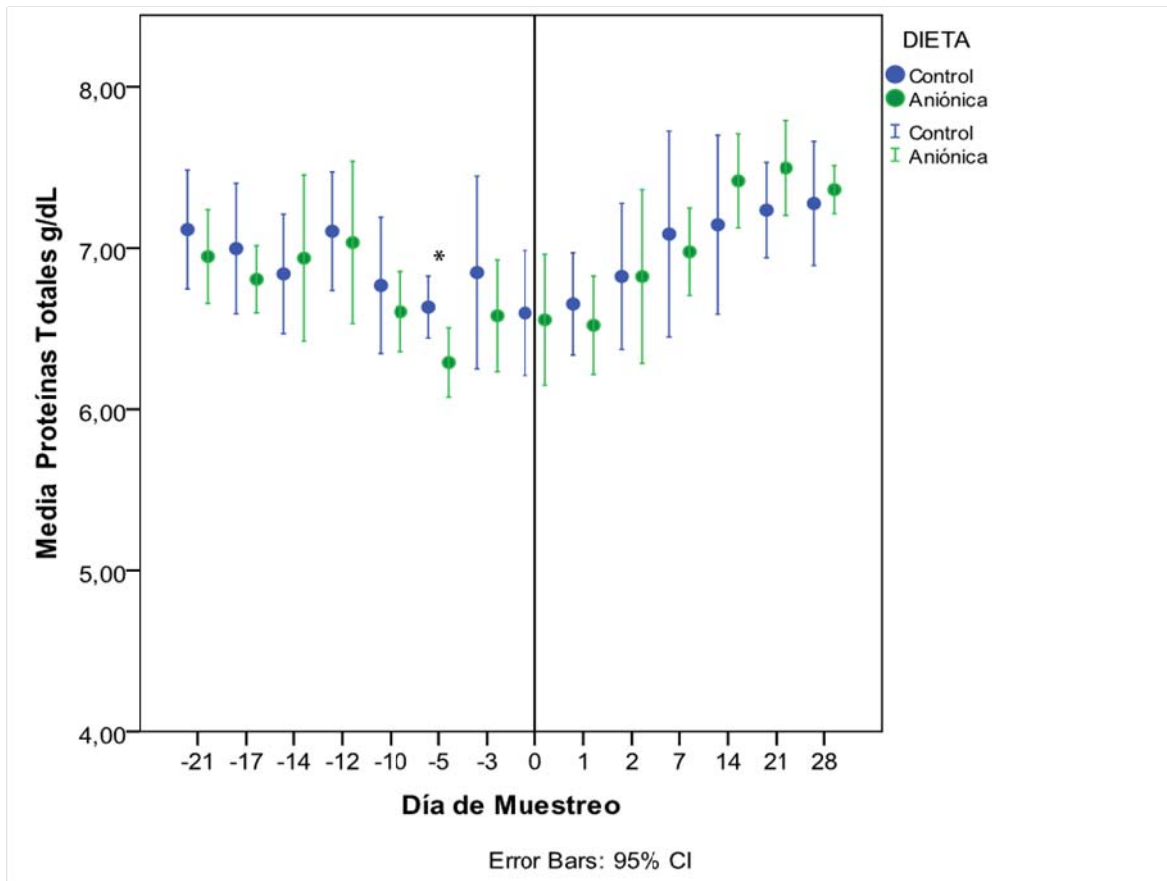
5.3.1. PROTEÍNAS SÉRICAS.

Proteínas (gr/dl)	Día de muestreo	N	Media	Desviación típica	Máximo	Mínimo	Dieta Control
	-21	7	7,11	0,35	7,71	6,85	
-17	7	6,99	0,43	7,70	6,45		
-14	7	6,84	0,40	7,43	6,46		
-12	7	7,10	0,39	7,81	6,55		
-10	7	6,76	0,45	7,24	6,11		
-5	7	6,63	0,21	6,94	6,29		
-3	7	6,84	0,64	8,11	6,14		
Parto	7	6,59	0,41	7,07	5,92		
1	7	6,65	0,34	7,36	6,31		
2	7	6,82	0,48	7,69	6,21		
7	7	7,08	0,69	8,38	6,40		
14	7	7,14	0,60	8,39	6,64		
21	7	7,23	0,32	7,69	6,92		
28	7	7,27	0,42	8,02	6,84		
Valores medios	7	6,93	0,44	7,68	6,44		

Tabla 40: Valores de las proteínas (gr/dl) en la dieta control según el día de muestreo.

Proteínas (gr/dl)	Día de muestreo	N	Media	Desviación típica	Máximo	Mínimo	Dieta Aniónica
	-21	10	6,94	0,40	7,62	6,38	
-17	10	6,80	0,29	7,26	6,32		
-14	10	6,93	0,67	8,53	6,28		
-12	10	7,03	0,70	8,42	6,23		
-10	10	6,60	0,34	6,97	6,01		
-5	10	6,29	0,30	6,75	5,82		
-3	10	6,58	0,48	7,54	5,86		
Parto	10	6,55	0,56	7,41	5,80		
1	10	6,52	0,36	7,02	6,10		
2	10	6,82	0,75	8,31	6,11		
7	10	6,97	0,38	7,42	6,35		
14	10	7,41	0,40	8,00	6,73		
21	10	7,49	0,41	8,05	6,84		
28	10	7,36	0,21	7,67	6,98		
Valores medios	10	6,88	0,45	7,64	6,27		

Tabla 41: Valores de las proteínas (gr/dl) en la dieta aniónica según el día de muestreo.



Gráfica 14: Representación de las proteínas (gr/dl) respecto al tiempo para las dos dietas. Dieta control (●), dieta aniónica (●). (**) (p<0,01). (*) (p<0,05).

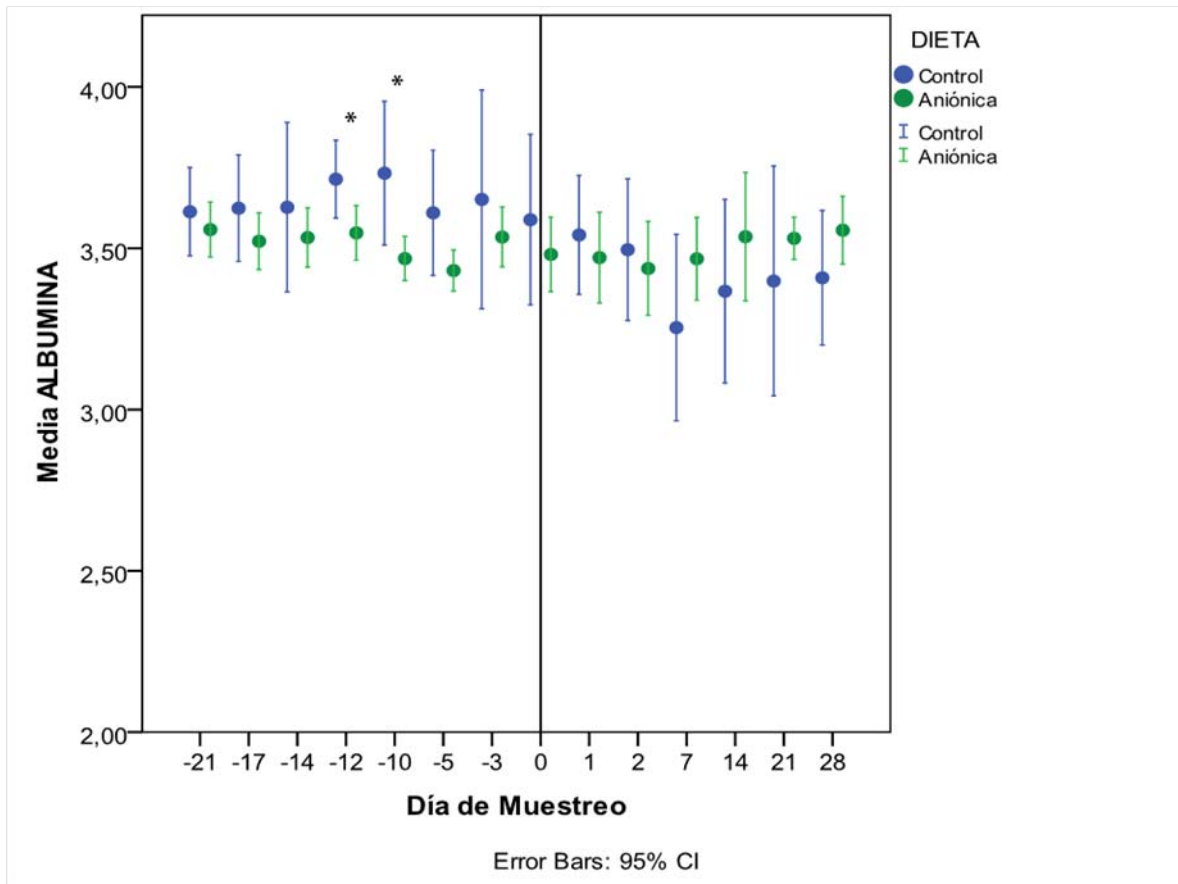
5.3.2. ALBÚMINA.

Albúmina (gr/dl)	Día de muestreo	N	Media	Desviación típica	Máximo	Mínimo	Dieta Control
	-21	7	3,61	0,13	3,74	3,37	
-17	7	3,62	0,17	3,90	3,36		
-14	7	3,62	0,28	3,88	3,14		
-12	7	3,71	0,13	3,84	3,53		
-10	7	3,73	0,24	3,98	3,33		
-5	7	3,61	0,20	3,97	3,36		
-3	7	3,65	0,36	4,11	3,21		
Parto	7	3,58	0,28	3,96	3,28		
1	7	3,54	0,19	3,81	3,31		
2	7	3,49	0,23	3,95	3,27		
7	7	3,25	0,24	3,56	2,82		
14	7	3,36	0,30	3,67	2,94		
21	7	3,39	0,38	3,91	2,80		
28	7	3,40	0,22	3,63	3,04		
Valores medios	7	3,54	0,24	3,85	3,20		

Tabla 42: Valores de la albúmina (gr/dl) en la dieta control según el día de muestreo.

Albúmina (gr/dl)	Día de muestreo	N	Media	Desviación típica	Máximo	Mínimo	Dieta Aniónica
	-21	10	3,55	0,11	3,70	3,33	
-17	10	3,52	0,12	3,76	3,37		
-14	10	3,53	0,11	3,73	3,35		
-12	10	3,54	0,11	3,79	3,33		
-10	10	3,46	0,09	3,63	3,33		
-5	10	3,43	0,08	3,55	3,27		
-3	10	3,53	0,12	3,76	3,33		
Parto	10	3,48	0,16	3,76	3,27		
1	10	3,47	0,16	3,70	3,22		
2	10	3,43	0,20	3,89	3,25		
7	10	3,46	0,17	3,78	3,28		
14	10	3,53	0,27	4,13	3,09		
21	10	3,53	0,09	3,66	3,36		
28	10	3,55	0,14	3,77	3,36		
Valores medios	10	3,50	0,13	3,74	3,30		

Tabla 43: Valores de la albúmina (gr/dl) en la dieta aniónica según el día de muestreo.



Gráfica 15: Representación de la albúmina (gr/dl) respecto al tiempo para las dos dietas. Dieta control (●), dieta aniónica (●).
 (**) (p<0,01). (*) (p<0,05).

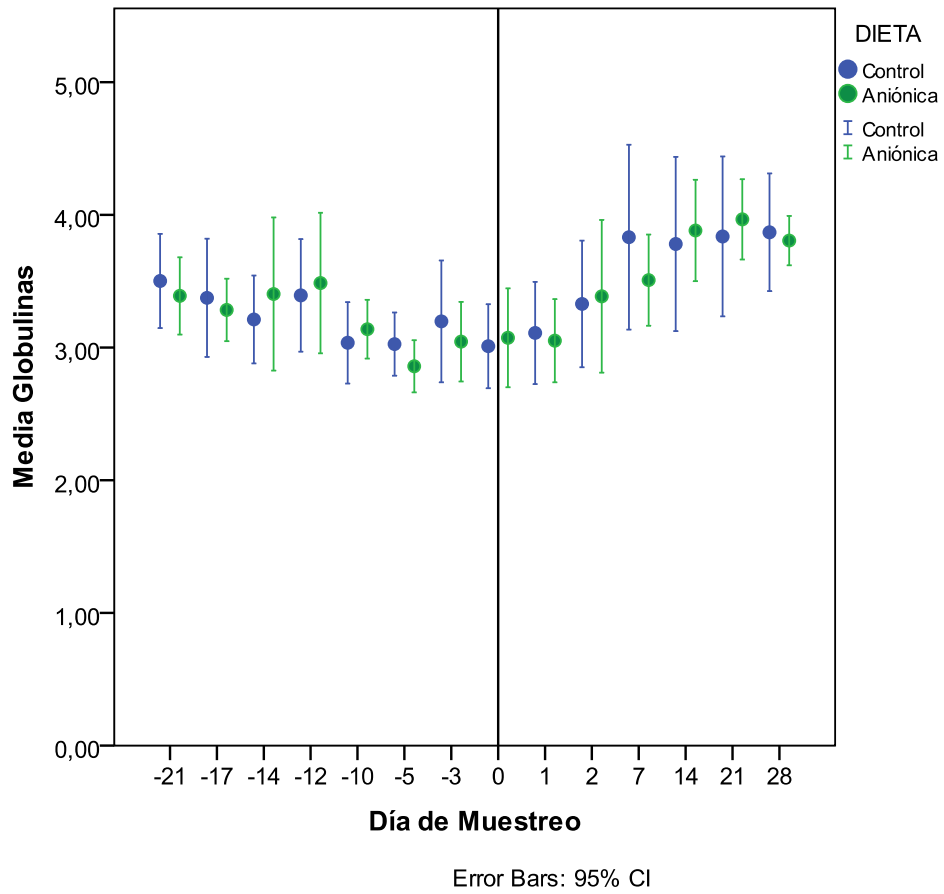
5.3.3. GLOBULINAS.

Globulinas (gr/dl)	Día de muestreo	N	Media	Desviación típica	Máximo	Mínimo	Dieta Control
	-21	7	3,50	0,33	4,02	3,18	
-17	7	3,28	0,32	3,69	2,72		
-14	7	3,40	0,75	5,18	2,71		
-12	7	3,48	0,74	5,09	2,69		
-10	7	3,13	0,30	3,58	2,60		
-5	7	3,02	0,25	3,29	2,69		
-3	7	3,19	0,49	4,00	2,66		
Parto	7	3,01	0,34	3,67	2,59		
1	7	3,11	0,41	4,02	2,75		
2	7	3,32	0,51	4,42	2,93		
7	7	3,83	0,75	5,27	3,11		
14	7	3,78	0,70	5,13	3,18		
21	7	3,83	0,65	4,89	3,01		
28	7	3,86	0,47	4,75	3,22		
Valores medios	7	3,41	0,50	4,36	2,86		

Tabla 44: Valores de las globulinas (gr/dl) en la dieta control según el día de muestreo.

Globulinas (gr/dl)	Día de muestreo	N	Media	Desviación típica	Máximo	Mínimo	Dieta Aniónica
	-21	10	3,38	0,40	3,94	2,79	
-17	10	3,28	0,32	3,69	2,72		
-14	10	3,53	0,11	3,73	3,35		
-12	10	3,48	0,74	5,09	2,69		
-10	10	3,13	0,30	3,58	2,60		
-5	10	2,85	0,27	3,40	2,43		
-3	10	3,04	0,41	3,95	2,53		
Parto	10	3,07	0,52	4,09	2,44		
1	10	3,05	0,37	3,80	2,61		
2	10	3,38	0,80	4,97	2,65		
7	10	3,50	0,48	4,14	2,69		
14	10	3,40	0,75	5,18	2,71		
21	10	3,96	0,42	4,51	3,30		
28	10	3,80	0,25	4,09	3,21		
Valores medios	10	3,35	0,44	4,15	2,77		

Tabla 45: Valores de las globulinas (gr/dl) en la dieta aniónica según el día de muestreo.



Gráfica 16: Representación de las globulinas (gr/dl) respecto al tiempo para las dos dietas. Dieta control (●), dieta aniónica (●). (**) ($p < 0,01$). (*) ($p < 0,05$).

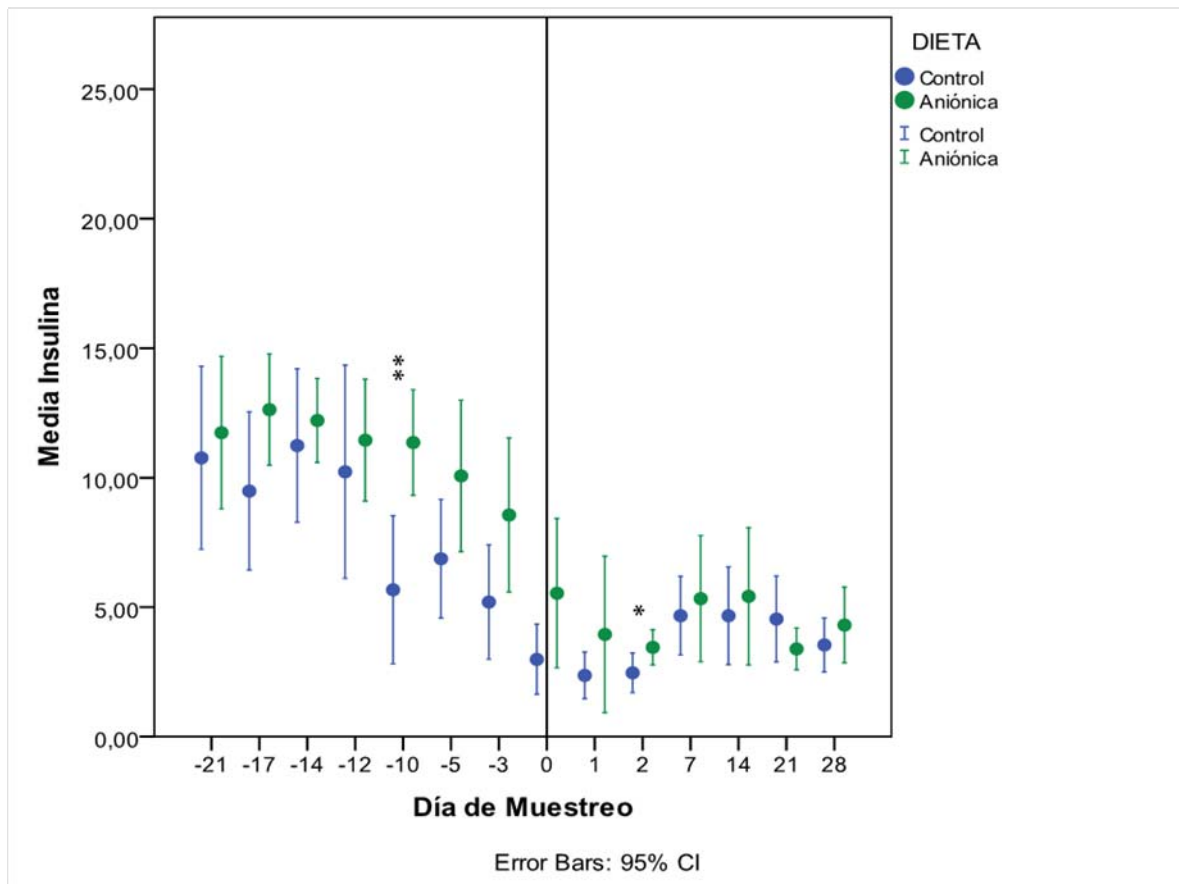
5.3.4. INSULINA.

Insulina (mcUI/mL)	Día de muestreo	N	Media	Desviación típica	Máximo	Mínimo	Dieta Control
	-21	7	10,76	3,36	14,60	5,90	
-17	7	9,48	3,30	16,70	2,60		
-14	7	11,24	3,20	14,90	4,90		
-12	7	10,22	4,45	17,30	4,40		
-10	7	5,67	3,09	10,10	2,10		
-5	7	6,87	2,47	9,50	3,10		
-3	7	5,20	2,38	8,90	2,00		
Parto	7	2,98	1,46	5,60	1,60		
1	7	2,36	0,85	3,20	1,10		
2	7	2,46	0,73	3,40	1,30		
7	7	4,67	1,63	7,50	2,80		
14	7	4,67	2,03	7,50	2,40		
21	7	4,54	1,79	7,90	3,30		
28	7	3,54	1,12	5,20	2,20		
Valores medios	7	6,05	2,28	9,45	2,84		

Tabla 46: Valores de la insulina (mcUI/mL) en la dieta control según el día de muestreo.

Insulina (mcUI/mL)	Día de muestreo	N	Media	Desviación típica	Máximo	Mínimo	Dieta Aniónica
	-21	10	11,74	4,11	16,80	5,10	
-17	10	12,63	3,00	16,40	8,30		
-14	10	12,21	2,10	15,90	8,90		
-12	10	11,45	3,28	16,60	7,00		
-10	10	11,36	2,84	16,20	8,40		
-5	10	10,07	4,08	15,00	4,80		
-3	10	8,56	4,15	16,70	3,00		
Parto	10	5,54	3,61	14,00	1,50		
1	10	3,95	3,61	12,50	1,30		
2	10	3,45	0,94	5,40	2,30		
7	10	5,33	3,40	13,30	2,10		
14	10	5,42	3,70	12,50	2,00		
21	10	3,39	1,12	6,20	2,40		
28	10	4,31	1,81	8,50	2,50		
Valores medios	10	7,82	2,98	13,29	4,26		

Tabla 47: Valores de la insulina (mcUI/mL) en la dieta aniónica según el día de muestreo.



Gráfica 17: Representación de la insulina (mUI/mL) respecto al tiempo para las dos dietas. Dieta control (●), dieta aniónica (●). (**) ($p < 0,01$). (*) ($p < 0,05$).

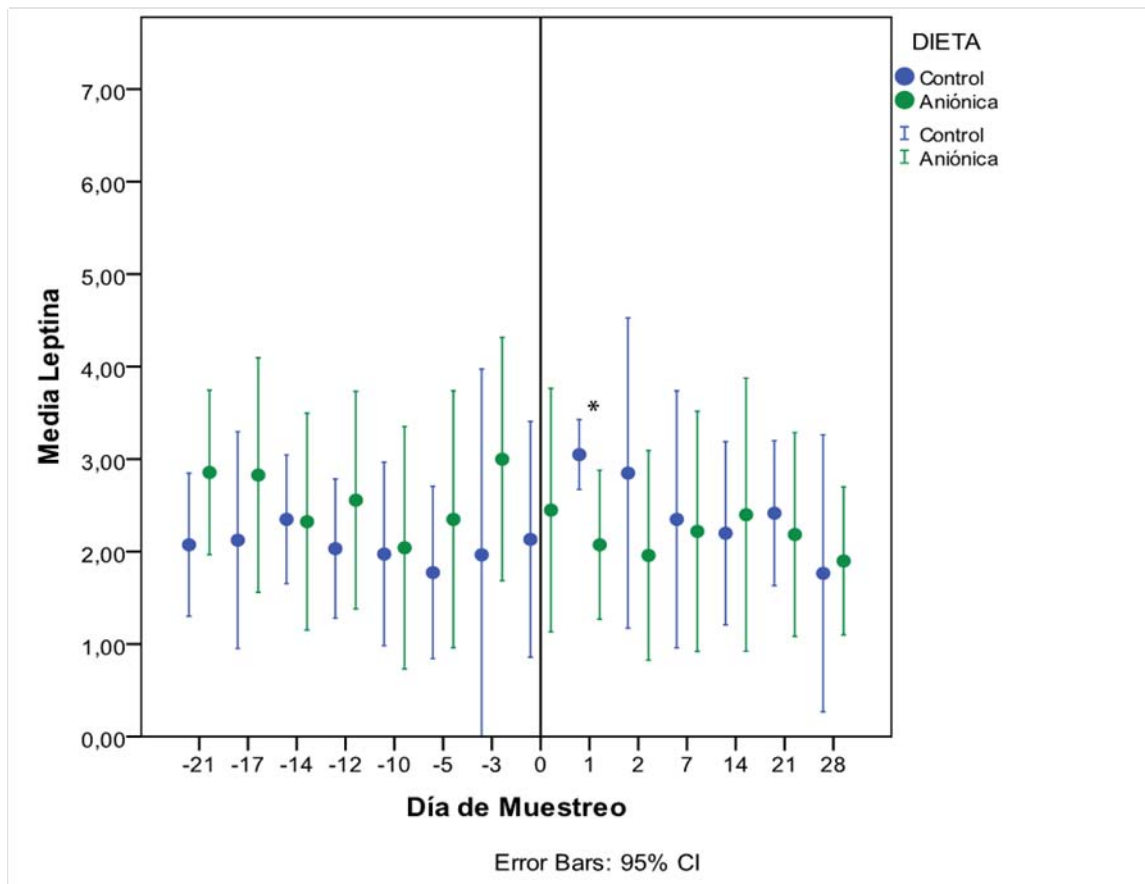
5.3.5. LEPTINA.

Leptina (ng/ml)	Día de muestreo	N	Media	Desviación típica	Máximo	Mínimo	Dieta Control
	-21	7	2,07	0,48	2,80	1,80	
-17	7	2,12	0,73	3,00	1,30		
-14	7	2,35	0,66	3,10	1,60		
-12	7	2,03	0,71	2,90	1,00		
-10	7	1,97	0,62	2,80	1,30		
-5	7	1,77	0,58	2,40	1,10		
-3	7	1,96	1,15	3,30	1,30		
Parto	7	2,13	0,51	2,70	1,70		
1	7	3,05	0,23	3,30	2,80		
2	7	2,85	1,48	3,90	1,80		
7	7	2,35	0,87	3,50	1,40		
14	7	2,20	0,79	3,40	1,30		
21	7	2,41	0,74	3,40	1,40		
28	7	1,76	0,60	2,40	1,20		
Valores medios	7	2,22	0,73	3,06	1,50		

Tabla 48: Valores de la leptina (ng/ml) en la dieta control según el día de muestreo.

Leptina (ng/ml)	Día de muestreo	N	Media	Desviación típica	Máximo	Mínimo	Dieta Aniónica
	-21	10	2,85	0,96	3,90	1,60	
-17	10	2,82	1,37	5,00	1,30		
-14	10	2,32	1,40	5,20	1,00		
-12	10	2,55	1,26	4,80	1,50		
-10	10	2,04	1,41	4,30	1,10		
-5	10	2,35	1,32	4,40	1,00		
-3	10	3,00	0,52	3,60	2,60		
Parto	10	2,45	0,82	3,10	1,30		
1	10	2,07	0,50	2,70	1,50		
2	10	1,96	0,91	3,20	1,10		
7	10	2,22	1,04	3,40	1,00		
14	10	2,40	1,18	3,70	1,20		
21	10	2,18	1,19	3,90	1,00		
28	10	1,90	0,98	3,50	1,00		
Valores medios	10	2,37	1,06	3,91	1,30		

Tabla 49: Valores de la leptina (ng/ml) en la dieta aniónica según el día de muestreo.



Gráfica 18: Representación de la leptina (ng/ml) respecto al tiempo para las dos dietas. Dieta control (●), dieta aniónica (●). (**) ($p < 0,01$). (*) ($p < 0,05$).

Discusión

6. DISCUSIÓN.

Estructuraremos la discusión siguiendo un esquema similar al que hemos empleado en el bloque de resultados con el fin de facilitar la comprensión de este trabajo.

6.1. EFECTO DE LA DCAD EN EL EQUILIBRIO ÁCIDO-BASE.

De forma general, podemos señalar que la suplementación de la dieta con sales aniónicas se acompañó, desde el inicio de su administración hasta el posparto, de una reducción del pH sanguíneo y urinario, disminución leve de los niveles de bicarbonato séricos y ligero incremento de la $p\text{CO}_2$, valores indicativos de la presencia de una acidosis metabólica leve.

En un análisis detallado de los diferentes parámetros podemos destacar que el pH sanguíneo mostraba valores inferiores en el grupo con dieta aniónica, desde el inicio del estudio hasta la primera semana posparto; manteniéndose nuestros resultados medios para ambas dietas dentro de los rangos fisiológicos de 7,27 y 7,50 (Swenson, 1993). Esto no es sorprendente, si tenemos en cuenta que el mantenimiento de la homeostasis ácido-base tiene una prioridad fisiológica mayor que la gestación o lactación (Fauchon *et al.*, 1995). Sin embargo, este cambio puede ser muy importante en la homeostasis cálcica, en la que se ha comprobado que pequeñas disminuciones en el pH sanguíneo tienen una gran influencia en la reabsorción ósea de calcio (Arnett, 2007).

En concordancia con nuestras observaciones, la mayoría de los autores han publicado valores de pH ligeramente inferiores en el grupo de animales alimentado con sales aniónicas, aunque no llegaron a encontrar diferencias estadísticamente significativas en el pH entre la dieta control y aniónica (Vagnoni y Oetzel, 1998; Schonewille *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2007a; Hersom *et al.*, 2010; Grünberg *et al.*, 2011). Tampoco en nuestro estudio observamos diferencias significativas durante el periodo que los animales ingieren las dietas. En este punto cabe recordar, que en el meta-análisis llevado a cabo por Charbonneau *et al.* (2006), aunque no encontraron diferencias significativas al analizar los estudios de manera individual, el meta-análisis demostró que la disminución de la DCAD tenía un efecto negativo significativo sobre el pH. La reducción fue biológicamente pequeña (-0,018 pH unidades, o -0,25%) y dentro de los valores fisiológicamente esperados de 7,35 a 7,45 (Constable, 1999).

Discusión

De los trabajos en los que se consiguió una disminución significativa del pH podríamos citar a Tucker *et al.*, (1988b) quienes describieron descensos significativos en el pH cuando añadían sales aniónicas, con una DCAD de -168 mEq/kg de MS o -268 mEq/kg de MS. También en esta línea, Roche *et al.* (2005) observaron un descenso lineal en el pH, en vacas en pastoreo, al disminuir la DCAD de +880 mEq/kg de MS a +230 mEq/kg de MS. Ambos equipos de investigación emplearon una cantidad de sales aniónicas mucho más elevada que la de nuestro trabajo. Recordemos que nuestra investigación se ha realizado en condiciones reales de una ganadería de producción lechera, por lo cual para evitar los posibles efectos secundarios de la ingesta de estas sales administramos una dieta con una DCAD positiva y sin llegar a efectuar un descenso tan acusado en la DCAD entre las dos dietas.

Con respecto al pH sanguíneo podemos observar que ya el primer día tuvimos una bajada del pH posiblemente debida al hecho de que algunos animales ya habían comenzado a ingerir la dieta 1 día antes del primer día de la toma de muestras una vez corregidas las fechas de muestreo teniendo en cuenta el día del parto. Esta rápida respuesta fue descrita por otros autores que administraron las sales aniónicas dos veces al día en animales a los que previamente se les practicó una fístula ruminal y, así, pudieron comprobar que las sales inducían cambios en el estado ácido-base de los animales a las 24 horas de su administración (Goff y Horst, 1998; Frömer, 2004; Löffler, 2004; Roche *et al.*, 2007). En los animales que ingieren por si mismos dietas aniónicas se suele observar una acidosis metabólica compensada en menos de 4 ó 5 días (Goff, 2008). A pesar del rápido descenso del pH en los primeros días de nuestro experimento, al igual que en el trabajo de Gelfert *et al.* (2007), cabe destacar la duración limitada de este efecto ya que en el resto del período de administración de la dieta, los animales parecen compensar de forma completa los cambios inducidos por las sales. Así, apreciamos que al cabo de 16 días de iniciar la alimentación con las sales aniónicas el pH en ambos grupos tiende a igualarse. Cabe recordar que aproximadamente a los 9 días las dietas con una baja DCAD mejoran la absorción de calcio (Roche *et al.*, 2007). Por lo que en base a nuestras observaciones y revisando el meta-análisis llevado a cabo por Lean *et al.* (2006), desde un punto de vista de su efecto sobre la homeostasis ácido-base sería recomendable el empleo de estas dietas durante períodos más cortos de tiempo ya que los cambios en el estado ácido-base se ponen de manifiesto en los primeros días de la adición de las sales pero parecen compensarse también de forma rápida (menos de 15 días).

La concentración de bicarbonato, al igual que sucede con el pH sanguíneo, disminuye de forma significativa en los primeros días del estudio (-21 y -14) manteniéndose siempre dentro de límites fisiológicos en los dos grupos. Al igual que en nuestro estudio, la casi totalidad de los trabajos revisados coinciden en que los animales, que ingieren una dieta con un elevado contenido de cloro y/o azufre, tienen niveles séricos más bajos de bicarbonato, confirmando la acidosis metabólica inducida por estas sales, aunque otros autores no han observado diferencias estadísticas (Chan *et al.*, 2006; Gelfert *et al.*, 2007; Charbonneau *et al.*, 2008; Heron *et al.*, 2009; Rérat *et al.*, 2009).

Del mismo modo que en los parámetros descritos con anterioridad, la concentración de la $p\text{CO}_2$ se mantuvo siempre dentro del rango fisiológico y nuestros valores medios fueron ligeramente superiores en la dieta aniónica (42,78 frente a 42,34 mmHg).

Estos resultados sugieren la presencia de acidosis respiratoria en lugar de alcalosis que sería la respuesta compensatoria esperada en animales con acidosis metabólica. Esta situación paradójica ha sido descrita en trabajos previos; así, Charbonneau *et al.* (2009) en su estudio observan el mismo valor de $p\text{CO}_2$ (43 mmHg) tanto para una dieta con una DCAD de +232 mEq/kg de MS como para otra a la que se le añaden sales aniónicas con una DCAD de -32 mEq/kg de MS y un valor mayor de $p\text{CO}_2$ (44 mmHg) a una tercera dieta con forraje bajo en potasio y una DCAD de -21 mEq/kg de MS. También Heron *et al.* (2009) obtuvieron un mayor valor para la $p\text{CO}_2$ (39,9 vs 39,0 mmHg) en la dieta con una DCAD de +41 mEq/kg de MS, que en el grupo con una DCAD más alta de +141 mEq/kg de MS.

La explicación más aceptada a este hallazgo es que la acidosis metabólica inducida por la dieta es compensada completamente por mecanismos no respiratorios, por lo que no hay diferencias en la concentración de $p\text{CO}_2$ (Ross *et al.*, 1994; Vagnoni y Oetzel, 1998; Roche *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2007b; Charbonneau *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008; Charbonneau *et al.*, 2009; Hersom *et al.*, 2010; Grünberg *et al.*, 2011).

Sin lugar a dudas en relación a la participación o no de la respiración en la compensación de la acidosis metabólica provocada por las sales aniónicas, existen resultados claramente contradictorios. Así, diversos investigadores observan que al disminuir la DCAD la $p\text{CO}_2$ decrece (Apper-Bossard *et al.*, 2006; Charbonneau *et al.*, 2008; Grünberg *et al.*, 2011) y por el contrario otros detectan un aumento de la $p\text{CO}_2$ al disminuir la DCAD (Charbonneau *et al.*, 2009; Heron *et al.*, 2009). De nuevo en el meta-análisis de Charbonneau *et al.* (2006) se encuentra, que al igual que en el caso del pH sanguíneo, se detectan diferencias

Discusión

significativas que no se podían demostrar en trabajos individuales. Así, se produce una reducción de -1,9 mmHg (-4,5%) en respuesta de una bajada de la DCAD de 300 mEq/kg, aunque la concentración de $p\text{CO}_2$ siempre se mantuvo dentro del rango fisiológico de 35 a 45 mmHg (Constable, 1999).

A esta discrepancia contribuye de forma importante el hecho de que, aunque para la valoración de la función pulmonar la utilización de sangre arterial es imprescindible, en nuestro caso y en de la mayor parte de los trabajos citados, excepto Ross *et al.* (1994), la determinación de la $p\text{CO}_2$ se realizó en sangre venosa por lo que la exactitud de estos resultados puede verse reducida. De todas formas, nuestras observaciones son comparables a los resultados de estas otras investigaciones citadas y bien pueden corroborar la explicación lógica del hallazgo paradójico de valores similares o superiores en las vacas consumiendo sales aniónicas como consecuencia de la compensación por mecanismos no respiratorios. Es muy posible, y teóricamente aceptado, que la primera respuesta del organismo para compensar el descenso de pH sea respiratoria tal como muestran los resultados del primer día (-21) de nuestro estudio (ver gráfica 1), pero, posteriormente, la respuesta del organismo (renal, ósea, etc.) consigue adaptar perfectamente el organismo a la nueva situación, manteniendo su homeostasis interna con garantías, incluso prescindiendo del mecanismo respiratorio, que si bien se comporta con eficacia en situaciones de urgencia no deja de ser más efímero.

A modo de resumen, podemos concluir que en nuestro estudio la acidosis provocada por la ingestión de las sales aniónicas no tuvo la entidad suficiente para generar una respuesta activa del componente respiratorio, al menos después de las primeras horas, y simplemente la compensación renal fue capaz de amortiguar dicha acidosis. También, Bender *et al.* (2003) y Gelfert *et al.* (2004) utilizando dietas con una DCAD positiva y sales aniónicas, en condiciones de campo, encontraron una acidosis metabólica completamente compensada.

Cabe citar que en la explotación comercial en la que realizamos nuestro estudio una de las patologías posparto más frecuentes es la cetosis subclínica, por lo que la variación observada en el posparto tanto para el pH sanguíneo, bicarbonato y pH urinario pudo ser debida a que algún animal del grupo aniónico padeció esta enfermedad metabólica.

El otro indicador para valorar el estado ácido-base es el pH urinario (Jardon, 1995; Goff *et al.*, 2004). El pH urinario de las vacas lecheras alimentadas con dietas catiónicas está por encima de 8,2 (Oetzel, 2002) y nuestros valores preparto para el pH urinario son de 8,48

para el grupo control y de 8,05 para el grupo aniónico. No observamos un descenso tan acusado en el pH urinario como otros autores ya que nosotros trabajamos con una DCAD positiva, pero, aún así, a lo largo de todo el parto observamos diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Esta disminución marginal en los valores del pH urinario dentro del rango fisiológico es coincidente con las observaciones de otros autores que suplementaron las dietas con sales, pero manteniendo la DCAD en valores mayores a cero (Fürl et al., 1996; Gelfert et al., 2004; Gelfert et al., 2007). En estos trabajos se considera que la dieta aniónica seguía siendo beneficiosa para el control de la paresia puerperal, pero en este caso la determinación de la excreción neta de ácido en orina podría ser un parámetro más útil para la monitorización de la respuesta que el pH.

El rango de valores óptimos a los cuales debe descender el pH urinario para disminuir efectivamente la incidencia de la fiebre de la leche todavía no ha sido identificado y las recomendaciones varían mucho según los autores consultados (Horst et al., 1997; Roche et al., 2003; Charbonneau et al., 2006, Constable et al., 2009). En el meta-análisis de Charbonneau et al. (2006) los autores sugieren que el pH urinario óptimo no debería bajar de 7 porque el riesgo de trabajar con un pH menor nos conduciría al problema de una excesiva acidificación y sólo obtendríamos un modesto beneficio en la prevención de la hipocalcemia (alrededor de 2,8 unidades de porcentaje) con respecto a reducir el pH sólo hasta 7. Dentro de esta línea, Ramos-Nieves et al. (2009) sugieren que diferencias de 1,5 unidades en el pH urinario del parto no resultan necesariamente en grandes diferencias en el nivel de calcio peripartal. Refrendando esta observación en los trabajos de Tucker et al. (1992) y Kurosaki et al. (2007) utilizando sales aniónicas y dietas con una baja DCAD disminuyeron el pH urinario hasta el rango 6-7 y no consiguieron mejoras en el nivel de calcio iónico ni en la prevención de la hipocalcemia. Todavía más contradictorio son los datos de Goff y Horst (1997), quienes encontraron que uno de los grupos, que estaban tratando con una DCAD alta y con un pH en la orina claramente alcalino (8,23), presentaba una elevada concentración de calcio iónico a las 12 horas posparto en comparación con los grupos que tenían un pH bajo.

Como hemos descrito anteriormente, las variaciones en el estado ácido-base se producen de forma rápida tras la administración de las sales y para no incurrir en una acidosis metabólica severa, uno de los métodos más sencillos es una correcta y pronta monitorización del pH urinario. Goff (2008) recomienda realizarla a las 48 horas o bien después de cada cambio en la ración. Mulligan et al. (2006) cita que en el caso de emplear

Discusión

sales aniónicas, como estrategia para prevenir la fiebre de la leche, se debe chequear como mínimo el pH urinario de 8 animales. Con el propósito de facilitar esta tarea, uno de los objetivos del presente trabajo era verificar la utilidad de la tira de orina para monitorizar el pH urinario en animales que recibían las sales aniónicas ya que en la bibliografía consultada todos los estudios emplean el peachímetro, que no está disponible de forma rutinaria en las granjas de nuestra zona de trabajo (Apper-Bossard *et al.*, 2006; Gelfert *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2007b; Kurosaki *et al.*, 2007; Liesegang *et al.*, 2007; Roche *et al.*, 2007; Charbonneau *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008; Heron *et al.*, 2009; Rérat *et al.*, 2009; Ramos-Nieves *et al.*, 2009; Charbonneau *et al.*, 2009; Degroot *et al.*, 2010; Seifi *et al.*, 2010; Grünberg *et al.*, 2011). En nuestro estudio, para los niveles de pH a los que trabajamos hallamos una correlación lineal entre ambos métodos ($r^2 = 0,823$; $p = 0,945$, gráfica 5 y tabla 21). Fidalgo *et al.* (2009), en un estudio previo ya habían descrito valores similares entre los dos métodos de medida y sólo observaron diferencias significativas entre los dos métodos en el grupo control entre el día del parto y las 48 horas posparto, concluyendo los autores que el control del pH urinario mediante la tira de orina es un método económico, sencillo y fiable aunque no permite predecir con precisión las variaciones de la calcemia a lo largo de este período.

Dada la dificultad de realizar un control del pH urinario con frecuencia a nivel granja sería recomendable trabajar, y así lo hemos hecho, con pequeñas cantidades de sales aniónicas que induzcan un estado de acidosis leve (Kurosaki *et al.*, 2007) ya que no nos debemos olvidar que el objetivo principal de la manipulación de la DCAD en el parto debería de ser reducir la incidencia de hipocalcemia, y no necesariamente modificar el pH sanguíneo o urinario (DeGaris y Lean, 2008a). En este sentido hay que recordar la relación lineal encontrada entre la DCAD y el riesgo de padecer fiebre de la leche (Charbonneau *et al.*, 2006; Lean *et al.*, 2006). Así, como podemos ver en la siguiente gráfica cualquier disminución en la DCAD reduce el riesgo de las vacas de sufrir hipocalcemia, y también como podemos observar la relación riesgo beneficio de trabajar en una granja con niveles de DCAD inferiores a 0 no estaría justificada, porque el perjuicio de causar una acidosis metabólica severa y una disminución en la ingestión de materia seca nos podrían conducir a un severo balance energético negativo seguido de un mayor riesgo de cetosis e hígado graso (Gelfert *et al.*, 2007).

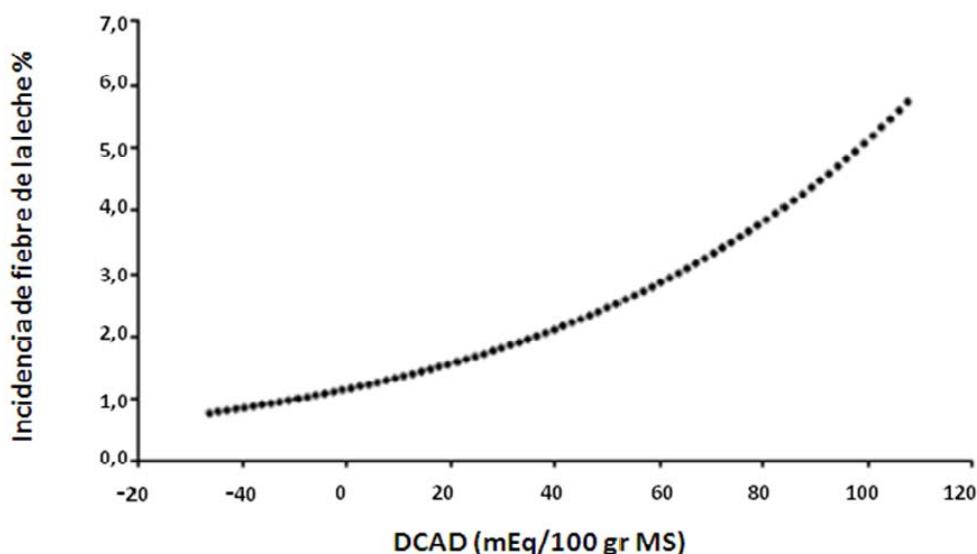


Figura 11: Relación lineal entre DCAD ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) + ($\text{Cl}^- + \text{S}^{2-}$) y riesgo de fiebre de la leche calculado como la transformación logit de la regresión lineal desarrollada por Lean *et al.* (2006) con una dieta de Ca, Mg y P del 0,35%, 0,40% y 0,40% de MS respectivamente, y una exposición a la dieta preparto de 14 días.

La validación de la tira de orina para determinar el pH urinario fue objeto de estudio por parte de Nappert y Naylor (2001) quienes examinaron muestras de orina de 57 vacas sanas para comprobar las correlaciones existentes entre el peachímetro de un laboratorio, tiras de orina, papel indicador de pH y un peachímetro portátil. Estos autores observaron diferencias significativas entre las lecturas del pH urinario del laboratorio y las obtenidas mediante las tiras de orina o el papel indicador de pH y proponen que una posible causa de los diferentes resultados entre estos métodos, es que para interpretar correctamente las tiras de orina y el papel indicador de pH, la luz juega un papel muy importante, y, en condiciones de granja a veces esta es escasa. A pesar de esto, concluyen que tanto las tiras de orina como el papel indicador de pH son dos métodos adecuados para evaluar el pH urinario, en especial cuando se trabaja con valores de pH por encima de 7 como sucede en nuestro trabajo. La validación de las tiras de orina también se ha realizado en otros animales como el caso de los gatos, para que los propietarios puedan monitorizar el pH urinario de los animales que padezcan urolitiasis (Raskin *et al.*, 2002). Estos autores evaluaron el pH medido con peachímetro en un laboratorio, dos tipos de peachímetros portátiles, tiras de orina y papel indicador de pH. Concluyen que para el pH urinario medio medido por ellos (pH 6) las tiras de orina y el papel

indicador de pH dan una idea aproximada del pH pero cuando es preciso una monitorización más exacta deberían emplearse los otros métodos. Por último en la especie humana, Wockenfus *et al.* (2013) observaron que a un pH urinario superior a 8 existe una buena concordancia entre los resultados obtenidos mediante el peachímetro de un laboratorio y las tiras de orina, por el contrario cuando tenemos un pH entre 7 y 8 la concordancia entre ambos métodos fue bastante pobre.

Teniendo en cuenta que el propio ganadero podría llevar a cabo la monitorización del pH urinario, de cara a un futuro sería interesante ver la correlación entre las determinaciones del pH urinario con tira por parte del ganadero, una persona entrenada y la medida del peachímetro. Nosotros actualmente, hemos comprobado en el trabajo experimental de la presente tesis doctoral que la correlación bivariada de los valores de pH en orina, medidos mediante tira reactiva o con peachímetro por dos veterinarios con experiencia clínica y de trabajo en laboratorio, era muy significativa (Correlación de Pearson 0,945), lo que nos permite considerar que el empleo de la tira de orina es un buen método de monitorización del pH urinario, al menos cuando la emplea personal con experiencia (tabla 21, gráfica 5).

6.2. EFECTOS DE LA DIETA EN LOS MINERALES SÉRICOS Y LA PTH.

6.2.1. SODIO, POTASIO Y CLORO.

En este apartado explicaremos, de forma conjunta, los cambios originados por la DCAD en la concentración sanguínea de sodio, potasio y cloro.

El sodio posee una la elevada absorción intestinal, alrededor del 90% (NRC, 2001), por lo que los niveles séricos de este mineral suelen ser un reflejo de la cantidad ingerida con la alimentación. A pesar de este hecho, en la mayoría de los estudios publicados, al igual que observamos nosotros, no se detectan diferencias significativas entre las dietas (Li *et al.*, 2008; Charbonneau *et al.*, 2009; Seifi *et al.*, 2010, Grünberg *et al.*, 2011) dado que hay múltiples factores que influyen en la absorción y mantenimiento de la natremia entre ellos:

- i. Aumento de la excreción renal de sodio en vacas que ingerían una dieta con una DCAD positiva (West *et al.* 1992). Siendo el sodio fundamental para el mantenimiento de diversas funciones vitales, el organismo controla de forma estricta su concentración en el fluido extracelular a través del sistema endocrino, que actúa sobre su excreción renal.

- ii. Incremento en la absorción intestinal de sodio en animales que ingerían dietas con sales aniónicas: Charbonneau *et al.* (2008) realizaron un trabajo en el que midieron la ingestión (gr/d), eliminación en las heces (gr/d), porcentaje de absorción sobre la ingestión, eliminación en la orina (gr/d) y porcentaje de la retención sobre la ingestión de sodio. Para ello establecieron tres dietas experimentales: una dieta control con una DCAD de +296 mEq/kg de MS, otra dieta basada en forrajes pobres en potasio con una DCAD de -24 mEq/kg de MS y, finalmente, otra dieta a la que se le añaden sales aniónicas (HCl) con una DCAD de -19 mEq/kg de MS. Los autores comprobaron que la ingestión de sodio fue similar en las tres dietas y que el porcentaje de absorción sobre la ingestión fue de un 43% para el grupo control y de un 63% para el grupo alimentado con sales aniónicas.
- iii. Absorción intestinal aparente más baja en vacas secas (Leclerc y Block, 1989; Delaquis y Block, 1995a): estos autores observaron en vacas secas unas variaciones en la absorción de sodio desde un 53% hasta un 83%. Por lo que aunque la absorción esperada sería cercana al 90%, Charbonneau *et al.* (2008) sugieren que, en base a los resultados de su estudio y a los trabajos previos anteriormente citados, la absorción aparente de sodio es más baja en las vacas no lactantes.

En nuestras vacas aunque, al igual que citan Grünberg *et al.* (2011), apreciamos después del parto un descenso de la natremia con valores muy por debajo de los del preparto no hemos podido establecer una explicación concreta a este hecho, si bien pudiera estar relacionado con la producción de leche (calostro en los primeros días).

Con respecto a la concentración sanguínea de potasio, a lo largo de todo el estudio, la caliemia fue superior en el grupo de las vacas alimentadas con sales aniónicas, excepto los días -17 y +14. Este hecho también es compartido por distintos autores que describen concentraciones más elevadas de este mineral en el grupo alimentado con sales aniónicas (Block, 1984; Vagnoni y Oetzel, 1998; Schonewille *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2008; Rérat *et al.*, 2009; Seifi *et al.*, 2010; Grünberg *et al.*, 2011). También, Goff y Horst (1997) utilizando tres dietas con diferente contenido de potasio (1,1, 2,1 y 3,1% MS), y a pesar de estas grandes diferencias en la ingesta de potasio, no detectaron variaciones en las concentraciones séricas de este mineral.

Discusión

Este hallazgo, aparentemente contradictorio, podría ser explicado por el papel de defensa de los cationes óseos frente a la acidosis metabólica. El potasio se liberaría desde el hueso en respuesta a la reducción del pH sanguíneo, más que por la disminución de la calciemia, y esto podría hacer que la concentración sanguínea de potasio fuese similar entre los individuos que consumen las diferentes dietas (Ross *et al.*, 1994). Charbonneau *et al.* (2009) diseñaron un estudio en el que emplearon una dieta control (DCAD de +232 mEq/kg de MS), una dieta con un silo con una baja DCAD (DCAD de -21 mEq/kg de MS) y otra dieta a la que añadieron sales aniónicas (DCAD de -32 mEq/kg de MS). El contenido en potasio fue de 1,83, 1,38 y 1,85 % MS, respectivamente. Estos investigadores observaron que a pesar de que la absorción de potasio, expresada como porcentaje de la ingestión, fue un 90% más baja (NRC, 2001) de lo esperado para las dos dietas con una baja DCAD, la calciemia fue similar en los tres grupos (3.9, 3.8 y 4.0 mEq/L, respectivamente).

Nuestros resultados, son muy similares a los obtenidos en el estudio de Grünberg *et al.* (2011); así, estos investigadores establecieron dos grupos, control con una DCAD de +110 mEq/kg de MS y otro al que se les administró sales aniónicas, durante 14 días antes de la fecha prevista del parto, con una DCAD de -90 mEq/kg de MS. En este trabajo, al igual que en el nuestro, sólo apreciaron diferencias significativas entre ambos grupos en el período del posparto, sin poder establecer una explicación fisiológica a este hallazgo.

Finalmente, el cloro, al igual que el sodio posee una elevada capacidad de absorción intestinal (entorno al 90%), por lo que los niveles séricos de este mineral suelen ser un reflejo de la cantidad ingerida con la alimentación (Takagi y Block, 1991). Nuestro grupo control siempre mantuvo la concentración plasmática de cloro ligeramente más elevada que el grupo con sales aniónicas, obteniendo significación estadística en días concretos tanto en el parto como en el posparto (gráfica 8). Esta observación no la vemos reflejada en la bibliografía consultada pues la mayoría de los trabajos, de la misma manera que ocurría con el sodio, no aprecian diferencias estadísticamente significativas aún cuando en algún estudio observan en días puntuales unos niveles de cloro en el grupo control más elevados (Li *et al.*, 2008; Charbonneau *et al.*, 2009; Seifi *et al.*, 2010; Grünberg *et al.*, 2011). Por el contrario, Chan *et al.* (2006) observaron que los animales alimentados con dieta aniónica en el parto tenían concentraciones plasmáticas superiores de cloro debido a la suplementación con sales aniónicas. También, Block (1984) encontró incrementos en la cloremia al aumentar el contenido en cloro de la dieta.

El único estudio que describe una cloremia superior, pero sin apreciar diferencias significativas, en el grupo control es el de Seifi *et al.* (2010) ya que reportan para una DCAD de +192 mEq/kg de MS una concentración de 101,89 mEq/L y para una DCAD de -80 mEq/kg de MS una concentración de 100,63 mEq/L. Para poder identificar el origen de los cambios de la cloremia sería necesaria la determinación de su excreción en heces y orina ya que la regulación de la concentración plasmática del cloro se realiza principalmente a través de la orina (Underwood y Suttle, 1999). Así, investigaciones previas (Charbonneau *et al.*, 2009) midieron la eliminación de cloro en heces y orina y observaron que estaba aumentada en las dietas con una baja DCAD, pero la cloremia fue siempre superior en el grupo con una baja DCAD.

Otro punto destacable de nuestro trabajo con respecto al cloro, es el descenso en la concentración plasmática que se produce en ambos grupos después del parto. Un hecho similar también es relatado por Grünberg *et al.* (2011) al apreciar en ambos grupos un descenso significativo de la concentración plasmática de cloro con valores muy por debajo de los del preparto. También Block (1984), describió un descenso significativo entre las concentraciones preparto y posparto, y cita como una posible causa la diferente concentración de cloro entre las dietas. Además, otros investigadores han detectado la existencia de relación entre las concentraciones de calcio y cloro sérico con una correlación lineal positiva muy significativa ($p < 0.0001$ y $r = 0,41$) en el momento del parto (Chan *et al.*, 2006).

6.2.2. CALCIO TOTAL, CALCIO IÓNICO, FÓSFORO Y MAGNESIO Y PTH.

La razón principal por la que se recomienda el empleo de sales aniónicas en el preparto es la prevención de la fiebre de la leche, por lo que el análisis de los cambios en la homeostasis cálcica en el grupo de animales que consumían dieta aniónica es uno de los puntos a los que hemos prestado más atención en este trabajo. Así, aunque para el calcio total e iónico abordaremos todo el periodo experimental haremos especial hincapié en las 24 y 48 horas posparto, por ser estos los momentos de mayor demanda de este mineral.

Una de las hipótesis más aceptadas por la que las dietas con una baja DCAD previenen la hipocalcemia es que la ingestión de estas dietas incrementan la movilización del calcio (Grünberg *et al.*, 2011). Así, la ingestión de dietas con una baja DCAD podría incrementar el calcio que penetra dentro del torrente circulatorio a través de tres mecanismos diferentes

Discusión

(Lomba *et al.*, 1978; Block, 1984; Schonewille *et al.*, 1994; Van Mosel *et al.*, 1994; Roche *et al.*, 2007).

- i. Aumento de la absorción intestinal.
- ii. Incremento de la reabsorción ósea.
- iii. Disminución de la neoformación ósea.

Estos dos últimos mecanismos sólo se desencadenan en presencia de acidosis metabólica (Grünberg *et al.*, 2011). También, la ingestión de dietas con una baja DCAD incrementa la excreción urinaria del calcio mediante la disminución de la reabsorción tubular de calcio a nivel renal (Stacy y Wilson, 1970; Fredeen *et al.*, 1988b). Así, este incremento en la movilización del calcio en el organismo de las vacas lecheras, permite que en el momento de más demanda y mayor estrés cálcico, como es el comienzo de la lactación, estas afronten este período más preparadas. En estos animales se producirá una reducción drástica en la excreción urinaria de calcio lo que constituye un mecanismo para mantener los niveles plasmáticos (Schonewille *et al.*, 1994).

En nuestro trabajo sólo hemos estudiado el comportamiento del calcio plasmático y podemos observar con respecto al calcio total que hasta el día del parto la concentración fue inferior en los animales que ingirieron sales aniónicas, alcanzando significación estadística desde el tercer día de la administración (día -17) hasta noveno día (día -12) (gráfica 9). Aunque no disponemos de datos de la excreción urinaria de calcio, esta rápida disminución de la concentración de calcio nos sugiere que debido a la ligera acidificación del plasma, estos animales presentarían una pérdida incrementada de este mineral en orina (Fredeen *et al.*, 1988b; Schonewille *et al.*, 1994; Kurosaki *et al.*, 2007). La situación se invierte entre las 24 y 48 horas posparto, donde los valores de calcio total son más altos en el grupo aniónico. Este hecho concuerda con el hallado en otros estudios donde el efecto de las dietas acidogénicas, con respecto al calcio, se manifiesta durante la etapa donde la demanda de calcio es más alta, como es el comienzo de la lactación (Vagnoni y Oetzel, 1998; Gasperlin *et al.*, 2002; Charbonneau *et al.*, 2006; Gelfert *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008; Ramos-Nieves *et al.*, 2009; DeGroot *et al.*, 2010; Seifi *et al.*, 2010).

Dentro de las posibles causas, que explicarían nuestro modesto incremento del calcio en las 24 y 48 horas posparto al compararlos con otros trabajos, podríamos citar:

- i. El empleo en otros estudios de vacas con alto riesgo de padecer hipocalcemia, como son las vacas multíparas de raza Jersey y que la diferencia de la DCAD entre las dietas es relativamente pequeña (Ramos-Nieves *et al.*, 2009) y siempre en valores positivos. Así, Wu *et al.* (2008) valoraron el comportamiento del calcio en cuatro grupos de vacas lecheras, a las que les administraron sales aniónicas 21 días antes de la fecha de parto, para conseguir cuatro niveles diferentes de DCAD (+127, +30, -50, -150 mEq/kg de MS). Estos investigadores observaron que sólo en los grupos con una DCAD negativa obtuvieron diferencias significativas con respecto al calcio total.
- ii. Otra posible explicación es la utilización de un escaso número de animales para evaluar la alta variabilidad estadística del calcio plasmático (DeGroot *et al.*, 2010).

Al valorar el efecto de las sales aniónicas en el calcio iónico existe una opinión generalizada de que las dietas con una DCAD negativa incrementan los niveles séricos de la fracción de calcio biológicamente activa (Wang y Beede, 1992b; Joyce *et al.*, 1997; Schonewille *et al.*, 1999; Kurosaki *et al.*, 2007). Sin embargo, este efecto teórico, sólo ha sido demostrado por Charbonneau *et al.* (2006) y Lean *et al.* (2006), en dos extensos meta-análisis, en los que comprobaron que una alimentación en el parto con una dieta con una baja DCAD produce un aumento en el calcio iónico estadísticamente significativo.

En nuestro estudio podemos observar que al igual que sucedía con el calcio total, detectamos una mayor calcemia en el grupo control con significación estadística en los mismos días peripartales (-17, -14, -12) y en el día -3 y en día del parto (día 0) (gráfica 10). Este resultado puede ser debido a que las dietas con una baja DCAD, típicamente, presentan una retención de calcio negativa (Gaynor *et al.*, 1989; VanMosel *et al.*, 1993; Schonewille *et al.*, 1994). En el momento de mayor estrés para la homeostasis cálcica como es el parto, detectamos que entre el día del parto y el día 1 en el grupo control se produce un descenso acusado en los niveles del calcio iónico de 0,86 mg/dl (de 4,84 a 3,98 mg/dl), mientras que para el grupo aniónico el descenso es de sólo 0,15 mg/dl (de 4,28 a 4,13). También constatamos que la concentración de calcio iónico en las 24 y 48 horas es ligeramente superior en los animales que consumieron sales aniónicas aunque sin alcanzar significación estadística.

A modo de resumen, tanto para el calcio total como para el calcio iónico, podemos afirmar que aunque no observamos significación estadística en las concentraciones plasmáticas de

este mineral entre las 24 y 48 horas posparto sus niveles son más altos en la dieta aniónica. Por último, todas las vacas, tanto del grupo control como del grupo aniónico, tuvieron concentraciones de calcio total mayores de 8 mg/dl, por lo que ningún animal padeció la patología de la hipocalcemia en cualquiera de sus variantes.

La concentración sanguínea de magnesio se mantuvo bastante estable a lo largo de todo el periodo experimental observándose pequeñas variaciones entre ambos grupos, sólo detectándose significación estadística el día 14. Tampoco una gran parte de los trabajos consultados describen diferencias estadísticas entre las concentraciones séricas de magnesio (Roche *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 2006; Seifi *et al.*, 2010 y Grünberg *et al.*, 2011).

Por el contrario, Li *et al.* (2008) observaron un aumento significativo en los niveles de magnesio plasmáticos al comparar la dieta con una DCAD más negativa con las otras dietas, aunque creen que en parte pudo ser debido a que utilizaron cloruro de magnesio como acidificante de la ración. Finalmente, Wu *et al.* (2008) emplearon cuatro dietas con distinta DCAD y sólo reportaron diferencias estadísticamente significativas en la dieta más negativa (DCAD -150 mEq/kg de MS) y apuntan como una posible causa de la elevación de este mineral se debe a que su ingestión es mayor en dietas ricas en aniones.

Cabe destacar que, a lo largo de nuestro estudio, nunca obtuvimos valores en ningún animal que nos indicara que se hallaba en un estado de hipomagnesemia. Por el contrario, Ramos-Nieves *et al.* (2009) observaron una incidencia del 20% de hipomagnesemia clínica (<1,1 mg/dl) y de un 80% de subclínica (1,1-1,8 mg/dl) entre el día 2 y 5 posparto, aunque aparentemente los animales no mostraron signos clínicos de la enfermedad. Este hecho sucedió a pesar de utilizar una concentración de magnesio en las dietas preparto de 0,47% para la dieta control y de 0,51% para la dieta aniónica, que están por encima de las que recomienda Goff (2004) para inducir el transporte pasivo de este mineral en el rumen y superar las posibles interacciones con otros minerales que perjudicarían el transporte activo. También, las concentraciones en el posparto (0,30%) fueron superiores a las que recomienda el NRC (2001), por lo que estos autores sugieren que o bien sus fuentes de magnesio en este estudio tuvieron una baja biodisponibilidad o que los requerimientos aportados por el NRC (2001) deberían de ser revisados.

Con respecto a la concentración sanguínea de fósforo. en nuestro estudio fue superior durante los 16 primeros días de la administración de las sales aniónicas en el grupo con la DCAD más baja, aunque sólo fue significativo el día -14 (gráfica 12). Conviene resaltar que

en ambos grupos se produjo una leve hipofosfatemia el día del parto y hasta el día 28 no se recuperaron los valores normales. Estos bajos niveles séricos de fósforo se corresponden con el comportamiento habitual en las vacas lecheras (Goff, 2006) y pueden ser debidos a una mayor excreción de este mineral en la leche (Grünberg *et al.*, 2011).

Otros trabajos publicados sobre la suplementación de las sales aniónicas muestran resultados inconsistentes respecto al fósforo sérico (Block, 1984; Goff *et al.*, 1991; Leclerc y Block, 1989; Oetzel *et al.*, 1988; Phillippo *et al.*, 1994; Vagnoni y Oetzel, 1998). Suponiendo que la disolución de los cristales de hidroxapatita (fosfato tricálcico) fuesen la fuente de calcio extra de la que disponen los individuos que reciben una dieta aniónica, lo lógico sería encontrar en estos animales un incremento de los niveles séricos no sólo de calcio sino también de fósforo (Joyce *et al.*, 1997). De acuerdo con esta observación, Chan *et al.* (2006) describieron una fosfatemia significativamente más alta en los individuos que ingerían la dieta aniónica y con un nivel de calcio en la ración de 1,5%, aunque este hecho pudo verse influenciado ya que esta dieta también tenía una mayor concentración de fósforo y sus niveles séricos están directamente relacionado con la ingestión de este mineral (Reinhardt *et al.*, 1988). Contrariamente, Goff y Horst (1997) encontraron valores más altos de fósforo en el preparto en una dieta con bajos niveles de calcio (0,5%) con respecto a otra con niveles más altos (1,5%).

Trabajos recientes, llevados a cabo por distintos autores no han detectado diferencias estadísticamente significativas respecto al fósforo (Li *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008; Degroot *et al.*, 2010; Seifi *et al.*, 2010, Grünberg *et al.*, 2011). Aunque Ramos-Nieves *et al.* (2009) observaron un descenso en la concentración sérica del fósforo en el periodo inmediato al parto, la fosfatemia en el preparto no se vio influenciada por el tratamiento, pero sí que los animales alimentados con una dieta con una baja DCAD tuvieron una fosfatemia significativamente mayor que los del grupo control durante el posparto, permitiendo que, especialmente el día del parto y hasta el día 2 se apreciara una baja tendencia y un significativo descenso en la hipofosfatemia clínica y subclínica en el grupo aniónico.

Al valorar la concentración de la PTH comprobamos que desde el inicio del ensayo (día -21) hasta el día 7 los valores de la PTH eran mayores en el grupo que recibió sales aniónicas que en el grupo control (gráfica 13), observando significación estadística prácticamente a lo largo de todo el periodo del preparto. Con respecto a los valores en el posparto la concentración de PTH descendió desde el día 1 y fue inferior a la del preparto.

Discusión

Esta rápida repuesta observada de la PTH es la esperada en función de los niveles de calcio, y por ello es más elevada en el grupo aniónico durante el parto (gráfica 10), donde el organismo promovería la liberación de calcio óseo. Así, Joyce *et al.* (1997) constataron que las variaciones en la concentración de calcitriol y PTH, entre las vacas que recibían una dieta rica en aniones o rica en cationes, eran los esperados ante un descenso de los niveles de calcio iónico en plasma. En este caso, las vacas que consumían la dieta con una DCAD positiva mostraban una concentración de calcio iónico más baja que las de una DCAD negativa y, consecuentemente, presentaban niveles mayores de PTH y calcitriol en suero. En ovejas, Espino *et al.* (2003) también comprobaron este tipo de comportamiento de la PTH después del parto, ya que observaron una mayor concentración de esta hormona en los animales que consumían una dieta alcalinizante, estando las concentraciones de la misma inversamente relacionadas con las concentraciones de calcio iónico.

Aunque el mecanismo de acción por el que actúan las sales aniónicas aún no es bien conocido, una de las hipótesis propone que en las dietas acidogénicas el aumento de la concentración de calcio sanguíneo es debida al incremento en el metabolismo óseo, como así lo indica el aumento en la concentración plasmática de la hidroxiprolina (Goff *et al.*, 1991) y, en ovejas, una mayor concentración de osteocalcina (Espino *et al.*, 2003). En estas circunstancias también se observa un descenso en la reabsorción tubular renal de calcio permitiendo liberar calcio óseo para mantener la concentración plasmática de calcio (Van Mosel *et al.*, 1994), mediado a través del incremento en la concentración plasmática de la PTH. En concordancia con esta hipótesis, Li *et al.* (2008) observan un incremento significativo de la PTH junto con una reducción de la osteocalcina a media que desciende la DCAD de la dieta.

Por el contrario, Kurosaki *et al.* (2007) no encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de la PTH durante el parto, pero comprobaron que el patrón de secreción de la PTH en el posparto era diferente dentro de cada grupo y no estaba asociado con la incidencia de hipocalcemia dentro de cada lote. También Horst *et al.* (1978) y Goff *et al.* (1991) sugieren que la secreción de la PTH en respuesta de la hipocalcemia en el momento del parto no está directamente asociada con la incidencia de la fiebre de la leche.

Grünberg *et al.* (2011) ponen en duda el papel de la acidosis en la sensibilidad del receptor de la PTH ya que a pesar de no encontrar un efecto de la dieta en el pH sanguíneo, la concentración total de calcio corregida por las proteínas fue mayor el día después del parto

en las vacas que consumían una dieta con una baja DCAD, indicando que otros mecanismos aparte del descenso en la sensibilidad del receptor de la PTH fueron responsables de su mayor acción, aspecto sobre el que nuestro estudio no puede realizar aportaciones.

6.3. EFECTO DE LA DIETA EN OTROS PARÁMETROS SÉRICOS DE INTERÉS: PROTEÍNAS TOTALES, ALBÚMINA, GLOBULINAS, INSULINA Y LEPTINA.

El efecto de las sales aniónicas sobre las proteínas ha sido valorado en un escaso número de trabajos y el significado fisiológico de esos cambios no están claros (Seifi *et al.*, 2010; Grünberg *et al.*, 2011). En nuestro trabajo la concentración de proteínas totales y globulinas se mantuvieron en valores similares para ambos grupos. Con respecto a la albúmina, esta permaneció con valores superiores en el grupo control hasta el día 2 posparto, y la situación se invertía a partir del día 7.

Al respecto de estos tres parámetros séricos, Grünberg *et al.* (2011) describen descensos significativos en distintos períodos de su estudio. Pero lo más destacable de este estudio es que las concentraciones de los tres parámetros investigados disminuyen después del parto en el grupo aniónico, hecho que sólo ocurrió en nuestro caso durante la primera semana postparto. De manera similar a lo observado en nuestro trabajo, Grünberg *et al.* (2011) sugieren que la disminución peripartal en la concentración de las proteínas totales puede ser debido a la disminución de la fracción de las globulinas, siendo su descenso antes del parto consecuencia de del incremento de la inmunoglobulina G₁ en la glándula mamaria, mientras que en el caso de la albúmina es debido al incremento en el volumen extracelular en respuesta a la demanda de la producción láctea (Larson y Kendall, 1957; McLennan y Willough, 1973) y debido al incremento en el porcentaje de engrasamiento hepático por el balance energético negativo presente en el periparto (Moore *et al.*, 2000; Sevinc *et al.*, 2003; Kessel *et al.*, 2008).

También debemos considerar que la acidemia crónica y la acidosis metabólica disminuyen la concentración de las proteínas, tanto en humanos como en los animales, aumentando el catabolismo proteico e incrementando mínimamente la síntesis de proteínas (Ballmer y Imoberdorf, 1995; Safranek *et al.*, 2003). La respuesta renal, ante una acidosis metabólica, consiste en una reducción en la excreción de bicarbonato y un incremento en la producción de amonio (Greco y Stabenfeldt, 1999). En estas circunstancias, el riñón extrae glutamina

del plasma para utilizarla en la producción de amoníaco y este aminoácido proviene de la proteólisis muscular. Los glucocorticoides participan en el control de la amoniogénesis renal, puesto que favorecen la degradación proteica y por lo tanto la liberación de glutamina, de ahí su concentración sanguínea incrementada en pacientes con acidosis metabólica (May *et al.*, 1986). Sin embargo, ni en nuestro trabajo ni en el de Grünberg *et al.* (2011) observamos un aumento en el catabolismo proteico, debido a que como citan estos investigadores, los estudios en medicina humana indican que la ingestión de dietas acidogénicas provocan una perturbación en el metabolismo proteico cuando existe una acidosis metabólica parcialmente descompensada (Hannaford *et al.*, 1982; Boirie *et al.*, 2000).

En la actualidad, se han realizado distintos estudios para saber cómo afectan las sales aniónicas administradas en el parto a las distintas hormonas, factores de crecimiento y metabolitos en el posparto (Ramos-Nieves *et al.*, 2009; Degroot *et al.*, 2010; Seifi *et al.*, 2010; Wathes, 2012). Una de las mayores limitaciones del empleo rutinario de las sales aniónicas es la disminución de la ingesta y los problemas que conlleva este proceso (Oetzel y Barmore, 1993; Goff y Horst, 2003a). En nuestro caso no era posible controlar de forma precisa la ingesta de los animales de forma individualizada, por lo que para ver parte del efecto de la dieta sobre el balance energético de los animales hemos valorado los niveles de leptina e insulina. Estas dos hormonas juegan un papel clave en informar al eje reproductivo del estado del balance energético de los animales (Butler, 2003; Meikle *et al.*, 2004) y nuestro trabajo es el primero que analiza el efecto de la administración de sales aniónicas sobre los niveles séricos de leptina e insulina.

La insulina es clave en la regulación del reparto de los nutrientes desde los tejidos corporales hacia la producción de leche en el periodo de transición de la gestación hacia la lactación (Laarveld *et al.*, 1981). En el posparto, esta hormona se puede emplear para predecir el estado metabólico y nutricional de las vacas lecheras (Cavestany *et al.*, 2009). Durante esta fase, las vacas de alta producción, necesitan altas concentraciones de lactosa, por lo que esta situación conlleva a un descenso en la concentración de glucosa e insulina (Van Knegsel *et al.*, 2005).

Los cambios producidos en la dieta de las vacas de producción láctea originan un inmediato y rápido estímulo en las hormonas y metabolitos, los más importantes de ellos son la glucosa y la insulina, y en el caso de que la alimentación sea deficitaria la concentración insulina puede verse reducida (O'Callaghan y Boland'1999). Así, con respecto a la concentración de esta hormona, hay que destacar que los niveles plasmáticos se mantuvieron más elevados

en los animales alimentados con sales aniónicas hasta el día 14 posparto. También, la concentración en ambos grupos fue mayor durante el parto que en el posparto al igual que citan trabajos previos, situación compatible con la mayor necesidad energética de la hembra que inicia la lactación (Holtenius *et al.*, 2003; Meikle *et al.*, 2004; Kokkonen *et al.*, 2005; Cavestany *et al.*, 2009).

Otros estudios (Ramos-Nieves *et al.*, 2009; Seifi *et al.*, 2010; Grünberg *et al.*, 2011) han intentado evaluar el balance energético en el posparto de las vacas que ingerían sales aniónicas, empleando distintos parámetros tales como NEFAS, betahidroxibutirato, glucosa e ingestión de materia seca, y no observaron efectos significativos en el balance energético durante el posparto. Por lo que, al igual que apreciamos en nuestro trabajo, el empleo de sales aniónicas durante las tres semanas previas al parto no parece tener efectos negativos sobre el balance energético en el posparto e incluso puede ser beneficioso según los resultados observados con la insulina. Sólo Moore *et al.* (2000) describen efectos adversos en el balance energético posparto de novillas alimentadas con dietas con una baja DCAD (-150 mEq/kg MS), ya que observaron un aumento en la concentración de triglicéridos en el hígado de estos animales.

Cabe destacar, en la bibliografía consultada, el trabajo llevado a cabo por Chan *et al.* (2005), ya que es el único estudio en el que midieron la concentración de la insulina durante la segunda y sexta semana posparto en tres dietas con diferente DCAD sin añadir sales aniónicas (+200, +350 y +500 mEq/kg MS). Al evaluar la concentración de esta hormona observaron que la concentración media de las tres dietas fue significativamente más baja en la segunda semana (8,4 μ IU/ml) que en la sexta (11,8 μ IU/ml), y por lo tanto, concluyen que probablemente el balance energético de estos animales fue más negativo en la segunda semana posparto. También pudieron comprobar que los niveles séricos de insulina no se veían afectadas por el tipo de dieta.

Con respecto a la concentración plasmática de la leptina, destacar que esta hormona mantuvo en ambos grupos unos valores muy similares a lo largo de todo el periodo experimental. La relevancia de medir la leptina en esta etapa de transición en el vacuno lechero viene dada porque durante el posparto, los animales presentan un estado de balance energético negativo en el que se produce una movilización de las reservas de grasa y todo el alimento ingerido se destina al energéticamente costoso proceso de la lactogénesis (Chagas *et al.*, 2007). La leptina, dentro de este proceso, actúa como barómetro corporal proporcionando un vínculo entre la homeostasis energética, el apetito y la función

Discusión

reproductiva (Bluher y Mantzoros, 2007; Zieba *et al.* 2008; Farooqi *et al.*, 2009). Así, la concentración plasmática de leptina se incrementa rápidamente al aumentar el tejido adiposo y la administración exógena de leptina disminuye el tejido adiposo y la ingestión de materia seca (Houseknecht *et al.*, 1998; Keisler *et al.*, 1999).

Debemos recordar que en trabajos previos se describe una concentración de leptina en las vacas gestantes y secas, un mes antes del parto, generalmente alta (5-9 ng/ml) (Kokkonen *et al.*, 2002). Esta concentración comienza a decrecer entre las semanas 4 y 1 preparto y alcanza el punto más bajo (3-6 ng/ml) durante la primera semana posparto. Así, en el periparto es frecuente observar disminuciones en la concentración plasmática de 3 ng/ml (Block *et al.*, 2001; Holtenius *et al.*, 2003; Hachenberg *et al.*, 2007; Konigsson *et al.*, 2008). Sin embargo, sí se ha observado un rápido incremento durante las semanas 1-2 (Kadokawa *et al.*, 2000) utilizando un RIA específico de rumiantes (Blache *et al.*, 2000).

El que no observáramos estas oscilaciones descritas en la bibliografía pudiera ser debido a que empleamos para la determinación sanguínea de esta hormona el kit comercial RIA multiespecies (Linco), y como cita Chilliard *et al.* (2005), en un estudio posterior al nuestro, este kit multiespecies no permite observar cambios significativos durante el periodo de transición de las vacas lecheras ya que está correlacionado positivamente, pero infravalorando los valores obtenidos por el RIA específico de rumiantes en el preparto, mientras que está correlacionado negativamente, por sobreestimar los valores en el posparto. Aún así, observamos una mayor leptinemia en el grupo control en los dos primeros días posparto siendo significativo el día 1 (gráfica 18). Este hecho es sumamente favorable para las vacas que ingirieron las sales aniónicas, ya que en un contexto de balance energético negativo, como es el principio de la lactación, una concentración plasmática baja de leptina podría promover un incremento rápido en la ingestión de materia seca de la dieta (Block *et al.*, 2001; Parola *et al.*, 2007). Este posible aumento en el consumo de materia seca lo vemos reflejado de manera indirecta en nuestro estudio en los niveles más altos de insulina en las vacas que se alimentaron con sales aniónicas. Tampoco apreciamos, al igual que Leury *et al.* (2003), que en el periodo del posparto estudiado la elevación en la concentración de insulina se corresponda con un aumento de la leptina.

Este estudio es de los pocos trabajos de investigación donde se pone de manifiesto el posible efecto beneficioso de las sales aniónicas sobre la ingesta de materia seca. Sin embargo, para confirmar estos indicios sería necesario un trabajo más amplio en él que se pudiese relacionar las variaciones de la ingesta de materia seca individual con los niveles de

leptina y otros parámetros metabólicos y reproductivos que afectan al posparto del vacuno lechero, algo que estaba fuera de los objetivos de nuestra investigación.

Conclusiones

7. CONCLUSIONES

1 La administración de la dieta aniónica indujo una acidosis metabólica leve y asintomática, sin la entidad suficiente para generar una respuesta compensatoria activa del componente respiratorio.

2 La monitorización del pH urinario mediante la tira de orina es un método económico, sencillo y fiable para valorar la eficacia de la administración de las sales aniónicas aunque no permite predecir las variaciones de la calcemia.

3 La ingesta de sales aniónicas mejora la disponibilidad de calcio en el momento de mayor demanda de este mineral manteniendo activos los mecanismos homeostáticos que aumentan su movilización desde los órganos de reserva.

4 La administración de sales aniónicas con el fin de prevenir la paresia puerperal debe realizarse en la proximidad del parto, ya que su efecto sobre la homeostasis ácido-base y cálcica se producen ya en los primeros días de la adición de las sales pero la compensación completa del organismo se produce de forma rápida.

5 Las concentraciones plasmáticas de insulina y leptina en el posparto sugieren que los animales que consumen dietas aniónicas pueden afrontar con mayores garantías el importante esfuerzo metabólico de la lactación sin llegar a sufrir balance energético negativo.

CONCLUSIÓN FINAL

A modo de conclusión final podemos afirmar que la administración de sales aniónicas durante el parto, obteniendo dietas con una DCAD próxima a cero, puede ser un buen método preventivo de la paresia puerperal hipocalcémica, de fácil aplicación en granjas comerciales con sistema de producción semiextensivo y sin riesgos para los animales.

Bibliografía

8. BIBLIOGRAFÍA.

- ABU-DAMIR, H.; M. PHILLIPPO, B.H. THORP, J.S. MILNE, L. DICK y I.M. NEVISO** (1994). Effects of dietary acidity on calcium balance and mobilisation, bone morphology and 1,25 dihydroxivitamin D in prepartal dairy cows. *Res. Vet. Sci.* 56: 310-318.
- ACCORSI, P.A.; N. GOVONI, R. GAIANI, C. PEZZI, E. SEREN y C. TAMANINI** (2005). Leptin, GH, PRL, Insulin and Metabolic Parameters Throughout the Dry Period and Lactation in Dairy Cows. *Reprod. Dom. Anim.* 40: 217–223.
- ADAM, C.L.; Z.A. ARCHER, P.A. FINDLAY, L. THOMAS y M. MARIE** (2002). Hypothalamic gene expression in sheep for cocaine- and amphetamine-regulated transcript, pro-opiomelanocortin, neuropeptide Y, agouti-related peptide and leptin receptor and responses to negative energy balance. *Neuroendocrinology.* 75: 250-256.
- AGGER, N; J.KATHOLM, K. LOMBORG, B. NYGAARD, K RUDEBECK y N.A. ZANGENBERG** (1997). A pharmacokinetic study of plasma calcium concentration in dairy cows following four oral administrations at 12 hour intervals around calving of a calcium chloride paste formulation. *The Bovine Proceedings.* 30: 72-75.
- AGGER, N.** (1998). A field efficacy study of a calcium chloride paste formulation for oral dosing of dairy cows in the prevention of milk fever. XX World Buiatrics Congress, 530.
- AGGER, N.; K. LOMBORG y N. ZANGENBERG** (2000a). Étude de la calcémie à la suite d'administration de calcium sous forme de pâte orale à des vaches laitières autour du vêlage. *Point. Vet.* 31 : 81-83.
- AGGER, N.; K. LOMBORG y N. ZANGENBERG** (2000b). Évaluation de la tolérance sur la muqueuse digestive de vaches laitières d'une pâte orale de chlorure de calcium. *Point. Vet.* 31: 85-87.
- AHIMA, R.S. y J. S. FLIER** (2000). Leptin. *Annu. Rev. Physiol.* 62: 413–437.
- ALONSO DÍEZ, A.J. y J.R. GONZÁLEZ MONTAÑA** (1997). Profilaxis de la paresia puerperal hipocalcémica bovina. *Med. Vet.* 14: 610-614.

- AMSTALDEN, M; D.A. ZIEBA, J.F. EDWARDS, P.G. HARMS, Jr. T.H. WELSH y R.L. STANKO** (2003). Leptin acts at the bovine adenohipophysis to enhance basal and gonadotropin-releasing hormone-mediated release of luteinizing hormone: differential effects are dependent upon nutritional history. *Bio. Reprod.* 69 (5): 1539–44.
- APPER-BOSSARD, E.; J.L. PEYRAUD, P. FAVERDIN y MESCHY** (2006). Changing dietary cation-anion difference for dairy cows fed with two contrasting levels of concentrate in diets. *J. Dairy. Sci.* 89: 749-760.
- ARNETT, T.** (2007). Acid-base regulation of bone metabolism. *Int. Congr. Ser.* 1297: 255–267.
- ATKINSON, D.E. y M.N. CAMIEN** (1982). The role of urea synthesis in the removal of metabolic bicarbonate and the regulation of blood pH. *Curr. Top. Cell. Regul.* 21: 261–303.
- AU, W.Y.W.** (1975). Effect of cortisol, betaestradiol and testosterone on parathyroid hormone secretion by rat parathyroid glands in vitro. *Fed. Proc.* 34: 336-338.
- AUBIN, J.E. y J.N. HEERSCHE** (1997). Vitamin D and osteoblasts. En: "Vitamin D". Feldman D., Ed., Academic Press, New York, pp. 313-328.
- AVIOLI, L.V.** (1981). Postmenopausal osteoporosis: prevention versus cure. *Fed. Proc.* 40: 2481-2482.
- AZRIA, M.** (1989). "The calcitonin. Physiology and Pharmacology". Karger, Basel, Switzerland.
- BAILEY, J.E. y L.S. PABLO** (1998). Practical approach to acid-base disorders. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 28: 645-661.
- BALLMER, P. E. y R. IMOBERDORF** (1995). Influence of acidosis on protein metabolism. *Nutrition.* 11: 462–468.
- BAR, A. y M. SACHS** (1980). Observations on the use of 1- α -hydroxycholecalciferol in the prevention of bovine parturient paresis. *Vet. Rec.* 106: 529-532.
- BAR, A.; S. STRIEM, R. PERLMAN y M. SACHS** (1988). Use of 1 alphahydroxyvitamin D3 in prevention of bovine parturient paresis. 8. Maternal and neonatal plasma

- calcium, parathyroid hormone and vitamin D metabolite concentrations. *J. Dairy Sci.* 71: 2723–2729.
- BARLER, P.** (2001). Disorders of calcium homeostasis en small animals. *In. Pract.* 5: 262-269.
- BARTON, B.A.; D.W HODNET; N.A JORGENSEN Y H.G DELUCA** (1984). 24,25-Dihydroxyvitamin D3 administration increases incidence of parturient paresis. *J. Dairy Sci.* 67: 1236–1239.
- BARTON, B.A.; N.A. JORGENSEN, y H.F. DELUCA** (1987). Impact of prepartum dietary phosphorus intake on calcium homeostasis at parturition. *J. Dairy Sci.* 70: 1186–1191.
- BAUMAN, D.E.** (2010). Regulation of nutrient partitioning during lactation: Homeostasis and homeorhesis revisited. In: *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction*. CAB.
- BAUMAN, D.E. y J.M. ELLIOT** (1983). Control of nutrient partitioning in lactating ruminants. In *Biochemistry of Lactation*. T. B. Mepham, ed. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands. pp. 437–468.
- BECK, N. y S.K. WEBSTER** (1976). Effects of acute metabolic acidosis on parathyroid hormone action and calcium mobilization. *Am. J. Physiol.* 230: 127-131.
- BECKMAN, M.J.; J.A. JOHNSON, J.P. GOFF, T.A. REINHARDT, D.C. BEITZ y R.L. HORTS** (1995). The role of dietary calcium in the physiology of vitamin D toxicity: Excess dietary vitamin D3 blunts parathyroid hormone induction of kidney 1-hydroxylase. *Arch. Bioch. Bioph.* 319: 535-539.
- BEEDE, D.K.; C. WANG, G.A. DONOVAN, L.F. ARCHBALD y W.K. SANCHEZ** (1992). Manipulating dietary cation-anion difference in late pregnancy: effects on subsequent calcium metabolism, health, and reproductive lactational performance of dairy cattle. En: "Proceedings Eastern States Veterinary Conference". Orlando, pp. 1-15.
- BELL, A y D.E. BAUMAN** (1997). Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia.* 2: 265–78.

- BELLOWS, C.G.; J.N HEERSCHE y J.E. AUBIN** (1990). Determination of the capacity for proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in the presence and absence of dexamethasone. *Dev Biol.* 140: 132–138.
- BENDER, S.; C.C. GELFERT y R. STAUFENBIEL** (2003) Use of urine samples for monitoring acid-base-equilibrium in herd health management of dairy cattle herds. *Tiera"rztliche Praxis* 31: 132–142.
- BERNABUCCI, U.; L. BASIRICO, N. LACETERA, P. MORERA, B. RONCHI, P.A. ACCORSI, E. SEREN y A. NARDONE** (2006). Photoperiod affects gene expression of leptin and leptin receptors in adipose tissue from lactating dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 89: 4678–4686.
- BIEDEFORD, F.A.; T.K. GRAY, J.H. WALSH y J.S. FORDTRAN** (1974). Effect of calcitonin on meal simulated gastric acid secretion and serum gastrin concentration. *Gastroenterology.* 66: 343-346.
- BIKLE, D.D.; E. GEE, B. HALLORAN y J.G. HADDAD** (1984). Free 1,25-dihydroxyvitamin D levels in serum from normalsubjects, pregnant subjects, and subjects with liverdisease. *J. Clin. Invest.* 74: 1966-1971.
- BIKLE, D.D.; P.K. SIITERI, E. RYZEN, J.G. HADDAD y E. GEE** (1985).Serum protein binding of 1,25-dihydroxyvitaminD: A reevaluation by direct measurement of freemetabolite levels. *J. Clin. Endocr. Metab.* 61: 969-975.
- BLACHE, D.; R.L. TELLAM, L.M. CHAGAS, M.A. BLACKBERRY, P.E. VERCOE y G.B. MARTIN** (2000). Level of nutrition affects leptin concentrations in plasma and cerebrospinal fluid in sheep. *J. Endocrinol.* 165:625–37.
- BLOCK, E.** (1984). Manipulating dietary anions and cations for prepartum dairy cows to reduce incidence of milk fever. *J. Dairy. Sci.* 67: 2939-2948.
- BLOCK, S.S.; J.M. SMITH, R.A. EHRHARDT, M.C. DIAZ, R.P. RHOADS, M.E. VAN AMBURGH e Y. R. BOISCLAIR** (2003). Nutritional and developmental regulation of plasma leptin in dairy cattle. *J. Dairy. Sci.* 86: 3206–3214.
- BLOCK, S.S.; W.R. BUTLER, R.A. EHRHARDT, A.W. BELL, M.E. VAN AMBURGH e Y.R. BOISCLAIR** (2001). Decreased concentration of plasma leptin in periparturient dairy cows is caused by negative energy balance. *J. Endocrinol.* 171: 339–48.

- BLUHER, S y C.S. MANTZOROS** (2007). Leptin in reproduction. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 14: 458-64.
- BLUM, J.W.; Y. ZBINDEN, H.M. HAMMON e Y. CHILLIARD** (2005). Plasma leptin status in young calves: effects of pre-term birth, age, glucocorticoid status, suckling, and feeding with an automatic feeder or by bucket. *Domest. Anim. Endocrinol.* 28: 119–33.
- BODA, J.M y H.H COLE** (1954). The influence of dietary calcium and phosphorus on the incidence of milk fever in dairy cattle. *J. Dairy. Sci.* 37: 360–371.
- BOIRIE, Y.; M. BROYER, M.F. GAGNADOUX, P. NIAUDET y J.P. BRESSON** (2000). Alterations of protein metabolism by metabolic acidosis in children with chronic renal failure. *Kidney Int.* 58: 236–241.
- BORUCKI CASTRO, S.I.; L.E. PHILLIP, V. GIRARD y A. TREMBLAY** (2004). Altering dietary cation-anion difference in lactating dairy cows to reduce phosphorus excretion to the environment. *J. Dairy. Sci.* 87: 1751–1757.
- BOSSAERT, P.; J.L.M.R. LEROY, S. DE VliegHER y G. OPSOMER** (2008). Interrelation between glucose-induced insulin response, metabolic indicators, and the time of first ovulation in high-yielding dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 91: 3363–71.
- BRADFORD, B. J.; M. OBA, R.A. EHRHARDT, Y.R. BOISCLAIR y M.S. ALLEN** (2006). Propionate is not an important regulator of plasma leptin concentration in dairy cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.* 30: 65–75.
- BRAITHWAITE, G.D** (1972). The effect of ammonium chloride on calcium metabolism in sheep. *Br. J. Nutr.* 27: 201-209.
- BRAUN, U.; B. BRYCE, A. LIESEGANG, M. HÄSSIG y U. BLEUL** (2008). Efficacy of oral calcium and/or sodium phosphate in the prevention of parturient paresis in cows. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 150: 331-8.
- BREUKINK, H.J.** (1991). Abomasal displacement, etiology, pathogenesis, treatment and prevention. *Bovine. Pract.* 26: 148-152.
- BROCKMAN, R.P. y B. LAARVELD** (1986). Hormonal regulation of metabolism in ruminants: a review. *Livest. Prod. Sci.* 14: 313–334.

- BRONNER, F.** (1987) Intestinal calcium absorption: Mechanisms and applications. *J. Nutr.* 117: 1347-1352.
- BROWN, E.G.; M.J. VANDEHAAR, K.M. DANIELS, J.S. LIESMAN, L.T. CHAPIN, D.H. KEISLER y M.S. NIELSEN** (2005). Effect of increasing energy and protein intake on body growth and carcass composition of heifer calves. *J. Dairy. Sci.* 88: 585–594.
- BROWN, E.M.** (1991). Extracellular Ca^{+2} sensing, regulation of parathyroid cell function, and role of Ca^{+2} and other ions as extracellular (first) messengers. *Physiol. Rev.* 7: 371-411.
- BROWN, E.M.; G. GAMBA; D. RICCARDI, M. LOMBARD, R. BUTTERS, O. KIFOR, A. SUN, M.A. HEDIGER, J. LYTTON y S.C. HEBERT** (1993). Cloning and characterization of an extracellular Ca^{+2} -sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature.* 366: 575-580.
- BROWN, E. M. y MACLEOD, R. J.** (2001). Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signalling. *Physiological Reviews.* 81: 239-297.
- BROZOS, C.N.; E. KIOSSIS, M.P. GEORGIADIS, S. PIPERELIS y C. BOSCOS** (2009). The effect of chloride ammonium, vitamin E and Se supplementation throughout the dry period on the prevention of retained fetal membranes, reproductive performance and milk yield of dairy cows. *Livest. Prod. Sci.* 124: 210–215.
- BUSHINSKY, D.A.** (1996). Metabolic alkalosis decreases bone calcium efflux by suppressing osteoclasts and stimulating osteoblasts. *Am. J. Physiol.* 271: F216–F222.
- BUTLER, W.R.** (2003). Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livest. Prod. Sci.* 83: 211–218.
- CANALIS, E.; G. MAZZIOTTI, A. GIUSTINA y J.P BILEZIKIAN** (2007). Glucocorticoidinduced osteoporosis: pathophysiology and therapy. *Osteoporos Int.* 18: 1319–1328.
- CANALIS, E.; J.M. HOCK y L.G. RAISZ** (1994). Anabolic and catabolic effects of parathyroid hormone on bone and interactions with growth factors. En: "The Parathyroids". Bilezikian, J.P.; R. Marcus y M.A. Levine, Eds., Raven Press, New York, pp. 65-82.

- CAPEN, C.C. y S.L. MARTÍN** (1983). Calcium-regulating hormones and diseases of the parathyroid gland. En: "Veterinary internal medicine: diseases of the dogs and cats". Ettinger, S.J., Ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 1551-1574.
- CARE, A.D.; R.C. BROWN, A.R. FARRAR y D.W. PICKARD** (1984). Magnesium absorption from the digestive tract of sheep. *Q. J. Exp. Physiol.* 69: 577–587.
- CARE, A.D. y R.F.L BATES** (1972). Control of secretion of parathyroid hormone and calcitonin in mammals and birds. *Gen. Comp. Endocrinol.* 3: 448-458.
- CAVESTANY, D.; M. KULCSÁR, D. CRESPI, Y. CHILLIARD, A. LA MANNA, O. BALOGH, M. KERESZTES, C. DELAUAUD, G. HUSZENICZA y A. MEIKLE** (2009). Effect of prepartum energetic supplementation on productive and reproductive characteristics, and metabolic and hormonal profiles in dairy cows under grazing conditions. *Reprod. Dom. Anim.* 44: 663–671.
- CHAGAS, L.M.; F.M. RHODES, D. BLACHE, P.J. S. GORE, K.A. MACDONALD y G.A. VERKERK** (2006). Precalving effects on metabolic responses and postpartum anestrus in grazing primiparous dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 89: 1981–1989.
- CHAGAS, L.M.; J.J. BASS, D. BLACHE, C.R. BURKE, J.K. KAY, D.R. LINDSAY, M.C. LUCY, G.B. MARTIN, S. MEIER, F.M. RHODES, J.R. ROCHE, W.W. THATCHER y R WEBB** (2007). Invited review: New perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of highproducing dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 90: 4022-4032.
- CHAMBERLAIN, A.T. y J.M. WILKINSON** (2002). Feeding the Dairy Cow. Chalcombe Publications, Lincoln, UK.
- CHAN, P.S; J.W. WEST, J.K. BERNARD y J.M. FERNANDEZ** (2005). The effects of increasing dietary cation-anion difference on dry matter intake, milk yield, and metabolic measures of the lactating dairy cow. *J. Dairy. Sci.* 88: 4384–4392.
- CHAN, P.S; J.W. WEST y J.K. BERNARD** (2006). Effect of prepartum dietary calcium on intake and serum and urinary mineral concentrations of cows. *J. Dairy. Sci.* 89: 704–713.
- CHARBONNEAU, E.; D. PELLERIN y G.R. OETZEL** (2006). Impact of lowering dietary cation–anion difference in nonlactating dairy cows: a metaanalysis. *J. Dairy. Sci.* 89: 537–548.

- CHARBONNEAU, E.; P.Y. CHOUINARD, G.F. TREMBLAY, G. ALLARD y D. PELLERIN** (2008). Hay to reduce dietary cation-anion difference for dry dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 91: 1585–1596.
- CHARBONNEAU, E.; P.Y. CHOUINARD, G.F. TREMBLAY, G. ALLARD y D. PELLERIN** (2009). Timothy silage with low dietary cation-anion difference fed to nonlactating cows. *J. Dairy. Sci.* 92: 2067–2077.
- CHATTOPADHYAY, N.; A. MITHAL y E. M. BROWN** (1996). The calcium-sensing receptor: a window into the physiology and pathophysiology of mineral ion metabolism. *Endocr. Rev.* 17: 289–307.
- CHAVASSIEUX, P.; P. PASTOUREAU; M.C. CHAPUY, P.D. DELMAS y P.J. MEUNIER** (1993). Glucocorticoid-induced inhibition of osteoblastic bone formation in ewes: a biochemical and histomorphometric study. *Osteoporos. Int.* 3: 97-102.
- CHELIKANI, P.K.; D.H. KEISLER, J.J. KENNELLY** (2003a). Response of plasma leptin concentration to jugular infusion of glucose or lipid is dependent on the stage of lactation of Holstein cows. *J. Nutr.* 133: 4163–4171.
- CHELIKANI, P.K.; D.R. GLIMM y J.J. KENNELLY** (2003b). Short communication: tissue distribution of leptin and leptin receptor mRNA in the bovine. *J Dairy Sci.* 86: 2369–2372.
- CHELIKANI, P.K.; J.D. AMBROSE, D.H. KEISLER y J.J. KENNELLY** (2004). Effect of short-term fasting on plasma concentrations of leptin and other hormones and metabolites in dairy cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.* 26: 33–48.
- CHENG, I.; M. E. KLINGENSMITH, N. CHATTOPADHYAY, O. KIFOR, R. R. BUTTERS, D. I. SOYBEL, y E. M. BROWN.** (1998). Identification and localization of the extracellular calcium-sensing receptor in human breast. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83: 703–707.
- CHILLIARD, Y** (1999). Metabolic adaptations and nutrient partitioning in the lactating animal. In: Martinet J, Houdebine LM, Head HH (eds), *Biology of Lactation*. Inserm/INRA, France, Paris, pp. 503–552.
- CHILLIARD, Y.; C. DELVAUD y M. BONNET** (2005). Leptin expression in ruminants: Nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Dom. Anim. Endocrinol.* 29: 3–22.

- CHILLIARD, Y; M. BONNET, C. DELAVALD, Y. FAULCONNIER, C. LEROUX y J. DJIANE** (2001). Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. *Dom. Anim. Endocrinol.* 21: 271–95.
- CLARK, W. JR.; J. WOHLT y R. GILBREATH.** (1986). Phytate phosphorus intake and disappearance in the gastrointestinal tract of high producing dairy cows. *J Dairy Sci.* 69: 3151–3155.
- COLLIP, J. B.** (1925) The extract of parathyroid hormone which prevents or controls parathyroid tetany and which regulates the level of blood calcium. *J. Biol. Chem.* 63: 395.
- CONSTABLE, P.D.** (1999). Clinical assessment of acid-base status. Strong ion difference theory. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim.* 15: 447-471.
- CONSTABLE, P. D.; C.C. GELFERT, M. FURLL, R. STAUFENBIEL y H. STAMPFLI.** (2009). Application of strong ion difference theory to urine and the relationship between urine pH and net acid excretion in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 70: 915–925.
- CONTRERAS, P.A.; R. MANSTON y B.F. SAMSON** (1982). Calcium homeostasis in hypomagnesaemic cattle. *Res. Vet. Sci.* 33: 10–16.
- COOK, G.M.; J.E. WELLS y J.B. RUSSELL** (1994). Ability of *Acidaminococcus fermentans* to oxidize trans-aconitate and decrease the accumulation of tricarballylate, a toxic end product of ruminal fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2533–2537.
- COOKE, N.E. y J.G. HADDAD** (1997). Vitamin D binding protein. En: "Vitamin D". Feldman D., Ed., Academic Press, New York, pp. 87-101.
- COOPER, M.S** (2004). Sensitivity of bone to glucocorticoids. *Clin. Sci.* 107: 111–123.
- COOPER, M.S.; A. BLUMSOHN, P.E GODDARD, W.A. BARTLETT, C.H SHACKLETON, R EASTELL, M.HEWISON y P.M STEWART** (2003). 11b-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity predicts the effects of glucocorticoids on bone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88: 3874–3877.
- CORBETT, R.B.** (2002). Influence of days fed a close-up dry cow ration and heat stress on subsequent milk production in western dairy herds. *J. Dairy. Sci.* 85 (Suppl. 1), 191.

- CRAIGE, A.H. y I.V. STOLL** (1947). Milk fever (parturient paresis) as a manifestation of alkalosis. *Am. J. Vet. Res.* 8: 168.
- DALLONGEVILLE, J; B. HECQUET, P. LEBEL, J.L. EDME, C. Le FUR y J.C. FRUCHART** (1998). Short-term response of circulating leptin to feeding and fasting in man: influence of circadian cycle. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 22: 728–33.
- DANDREA, J; S. PEARCE, G. DAVIDSON, C. MORRISON, P. GODDARD y D.H. KEISLER** (2002). Hourly measurement of plasma leptin and cortisol concentrations in non-pregnant ewes under group housing conditions over 23 h. In: Proceedings of the British Society of Animal Science Annual Meeting. pp. 89.
- DANIEL, J.A.; B.K. WHITLOCK, J.A. BAKER, B. STEELE, C.D. MORRISON y D.H. KEISLER** (2002). Effect of body fat mass and nutritional status on 24-h leptin profiles in ewes. *J. Anim. Sci.* 80: 1083–9.
- DE BLAS, C.; C. RESCH, J. AMOR y P. GARCÍA** (1999). Utilización de sales aniónicas en dietas para vacas secas. *Prod. Anim.* 141: 48-58.
- DEGARIS, P.J. e I.J. LEAN** (2008a). Milk fever in dairy cows: A review of pathophysiology and control principles. *Vet. J.* 176: 58–69.
- DEGARIS, P.J.; I.J. LEAN, AR RABIEE y C. HEUER** (2008b). Effects of increasing days of exposure to prepartum transition diets on milk production and milk composition in dairy cows. *Aust. Vet. J.* 86: 341-351.
- DEGROOT, M.A.** (2004). The effect of prepartum anionic supplementation on periparturient feed intake and behaviour, health and milk production. Thesis doctoral. Doctor of Philosophy in Animal Sciences, Oregon State University. USA.
- DEGROOT, M.A; E. BLOCK y P.D. FRENCH** (2010). Effect of prepartum anionic supplementation on periparturient feed intake, health, and milk production. *J. Dairy. Sci.* 93: 5268-5279.
- DELAQUIS, A.M. y E. BLOCK** (1995a). Acid-base status, renal function, water, and macromineral metabolism of dry cows fed diets differing in cation-anion difference. *J. Dairy. Sci.* 78: 604-619.

- DELAQUIS, A.M. y E. BLOCK** (1995b). Dietary cation-anion difference, acid-base status, mineral metabolism, renal function, and milk production of lactating cows. *J. Dairy. Sci.* 78: 2259-2284.
- DELAVAUD, C; A. FERLAY, Y. FAULCONNIER Y, F. BOCQUIER, G. KANN e Y. CHILLIARD** (2002). Plasma leptin concentration in adult cattle: effects of breed, adiposity, feeding level, and meal intake. *J. Anim. Sci.* 80: 1317–28.
- DELUCA, H.F.; J. KRISINGER y H. DARWISH** (1990). The vitamin D system. *Kidney. Int.* 38: 2-8.
- DHIMAN, T.R. y V. SASIDHARAN** (1999). Effectiveness of calcium chloride in increasing blood calcium concentrations of periparturient dairy cows. *J. Anim. Sci.* 77: 1597-1605.
- DISHINGTON, I.W** (1975). Prevention of milk fever (hypocalcemic paresis puerperalis) by dietary salt supplements. *Acta. Vet. Scand.* 16: 503-512.
- DISHINGTON, I.W. y J BJORNSTAD** (1982). Prevention of milk fever by dietary means. *Acta. Vet. Scand.* 23: 336–343.
- DISKIN, M.G.; D.R. MACKEY, J.F. ROCHE y J.M. SREENAN** (2003). Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Anim.Reprod. Sci.* 78: 345–370.
- DOHOO, I.; W. MARTIN y H. STRYHN** (2003). Veterinary Epidemiologic Research. AVC Inc., Charlottetown, Canada.
- DOREAU, M. y A. FERLAY** (1994). Digestion and utilization of fatty acids by ruminants. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 45: 379–396.
- DOUGLAS, G; T. OVERTON, H. BATEMAN y J.K. DRACKLEY** (2004). Peripartal metabolism and production of Holstein cows fed diets supplemented with fat during the dry period. *J Dairy Sci.* 87: 4210–4220.
- DRACKLEY, J.K.; S.S. DONKIN y C.K. REYNOLDS** (2006). Major Advances in Fundamental Dairy Cattle Nutrition. *J. Dairy. Sci.* 89: 1324–1336
- DUCUSIN, R.J.; Y. UZUKA, E. SATOH, M. OTANI, M. NISHIMURA, S. TANABE y T. SARASHINA** (2003). Effects of extracellular Ca^{2+} on phagocytosis and intracellular

Bibliografía

Ca²⁺ concentrations in polymorphonuclear leukocytes of postpartum dairy cows. *Res. Vet. Sci.* 75: 27–32.

DURST, R.A. y O. SIGGARD-ANDERSON (1994). Electrochemistry. En: "Tiezt textbook of clinical chemistry". Burtis, A.B. y E.R. Ashwood, Eds., W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 159-182.

DVORAK, M.; M.; A SIDDIQUA, D. T. WARD, D.CARTER, S. L DALLAS, E. F. NEMETH y D. RICCARDI (2004). Physiological changes in extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calciotropic hormones. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 101: 5140-5145.

DYER, C.J.; J.M. SIMMONS, R.L. MATTERI y D.H. KEISLER (1997). Leptin receptor mRNA is expressed in ewe anterior pituitary and adipose tissues and is differentially expressed in hypothalamic regions of well-fed and feed-restricted ewes. *Domest. Anim. Endocrinol.* 14: 119–128.

DYERRE, H. y J.R. GREIG (1925). Milk fever: its possible association with derangements in the internal secretions. *Vet. Rec.* 5: 525-528.

EBISUNO, S; S. MORIMOTO, S. YASUKAWA y T. OHKAWA (1991). Results of long-term rice bran treatment on stone recurrence in hypercalciuric patients. *Br. J. Urol.* 67: 237–240.

EHRHARDT, R.A.; A.W. BELL e Y.R. BOISCLAIR (2002). Spatial and developmental regulation of leptin in fetal sheep. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 282: R1628–1635.

EHRHARDT, R.A.; R.M. SLEPETIS, J. SIEGAL-WILLOTT, M.E. VAN AMBURGH, A.W. BELL e Y.R. BOISCLAIR (2000). Development of a specific radioimmunoassay to measure physiological changes of circulating leptin in cattle and sheep. *J. Endocrinol.* 166: 519–528.

EIJKEN, M.; M. KOEDAM, M. VAN DRIEL, C.J. BUURMAN, H.A. POLS y J.P. VAN LEEUWEN (2006). The essential role of glucocorticoids for proper human osteoblast differentiation and matrix mineralization. *Mol. Cell. Endocrinol.* 248: 87–93.

- ENDER, F.; I.W. DISHINGTON y A. HELGEBOSTAD** (1962). Parturient paresis and related forms of hypocalcaemic disorders induced experimentally in dairy cows. *Acta. Vet. Scand.* 3: 5–52.
- ENDER, F.; I.W. DISHINGTON y A. HELGEBOSTAD** (1971). Calcium balance studies in dairy cows under experimental induction and prevention of hypocalcaemic paresis puerperalis. The solution of the aetiology and the prevention of milk fever by dietary means. *Z. Tierphysiol. Tierernaehr. Futtermittelkd.* 28: 233-256.
- ENDRES, D.B. y R.K. RUDE** (1994). Mineral and bone metabolism. En: "Tiezt textbook of clinical chemistry". Burtis, A.B. y E.R. Ashwood, Eds., W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp.1887-1973.
- ENEVOLDSEN, C.** (1993). Nutritional risk factors for milk fever in dairy cattle: meta-analysis revisited. *Acta. Vet. Scand Suppl.* 89: 131–134.
- ESPINO, L.** (2003). Efectos de la diferencia de cationes y aniones de la dieta en la homeostasis ácido-base y mineral y en la morfología ósea en ovejas. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. Facultad de Veterinaria de Lugo.
- ESPINO, L; F. GUERRERO, M.L. SUÁREZ, G. SANTAMARINA, A. GOICOA y L.E. FIDALGO** (2003). Long-term effects of dietary anion-cation balance on acid-base status and bone morphology in reproducing ewes. *J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.* 50: 488-495.
- ESPINO, L; M.L. SUÁREZ; G. SANTAMARINA; A. GOICOA y L.E. FIDALGO** (2005). Effects of dietary cation-anion difference on blood cortisol and ACTH levels in reproducing ewes. *J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.* 52: 8-12.
- ESTEPA, J.C.; E. AGUILERA-TEJERO, I. LOPEZ, Y. ALMADEN, M. RODRÍGUEZ y A.J. FELSENFELD** (1999). Effect of phosphate on parathyroid hormone secretion in vivo. *J. Bone. Miner. Res.* 14: 1848-1854.
- FARLEY, J.R.; J.E. WERDEGAL, S.L. HALL, S. HERRING y N.M. TARBAUX** (1991). Calcitonin has direct effect on 3(H)-thymidine incorporation and alkaline phosphatase activity in human osteoblast-line cells. *Calcif. Tissue. Int.* 48: 297-301.

- FAROOQI, I.S. y S. O'RAHILLY** (2009). Leptin: a pivotal regulator of human energy homeostasis. *Am. J. Clin. Nutr.* 89: 980S-984S.
- FAUCHON, C.; J.R. SEOANE y J.F. BERNIER** (1995). Effects of dietary cation-anion concentrations on performance and acid-base balance in growing lambs. *Can. J. Anim. Sci.* 75: 145-151.
- FEDERACIÓN ESPAÑOLA PARA EL DESARROLLO DE LA NUTRICIÓN ANIMAL.** (2009). Normas F.E.D.N.A: Necesidades nutricionales para rumiantes de leche.
- FEUERMANN, Y.; A. SHAMAY y S.J. MABJEESH** (2008). Leptin Up-Regulates the Lactogenic Effect of Prolactin in the Bovine Mammary Gland In Vitro. *J. Dairy. Sci.* 91: 4183-4189.
- FIDALGO, L.E.; J. RAMOS; G. SANTAMARINA, M^a.L. SUÁREZ, L. ESPINO y A. GOICOA** (2000). Indicadores bioquímicos de la homeostasis cálcica y de la actividad corticoadrenal en vacas parécicas. *Med. Vet.* 17: 194-201.
- FIDALGO, L.E.; J.L. BENEDITO; A. GOICOA; J. RAMOS; G. SANTAMARINA y C. CASTILLO** (1994). Evolución clínica de la paresia puerperal en Galicia. En: "IV Congreso Nacional de Buiatría", A Coruña, pp. 21-24.
- FIDALGO, L.E.; L. ESPINO, L. RIGUEIRA y J. GARCÍA** (2009). Validación del uso de la tira de orina para la monitorización del pH urinario durante el parto en vacas de leche. XIV Congreso Internacional Anembe de Medicina Bovina. La Coruña Mayo 2009.
- FIGUEIREDO, M.D.; D.V. NYDAM; G.A. PERKINS; H.M. MITCHELL y T.J. DIVERS** (2006). Prognostic Value of Plasma L-Lactate Concentration Measured Cow-Side with a Portable Clinical Analyzer in Holstein Dairy Cattle with Abomasal Disorders. *J Vet Intern Med.* 20: 1463-1470.
- FREDEEN, A.H.; E.J. DEPETERS y R.L. BALDWIN** (1988a). Characterization of acid/base disturbances and effects on calcium and phosphorus balances of dietary fixed ions in pregnant or lactating does. *J. Anim. Sci.* 66: 159-173.
- FREDEEN, A.H.; E.J. DEPETERS y R.L. BALDWIN** (1988b). Effects of acid-base disturbances caused by differences in dietary fixed ion balance on kinetics of calcium metabolism in ruminants with high calcium demand. *J. Anim. Sci.* 66: 174-184.

- FRIEDMAN, J. y F.A. GESEK** (1993). Calcium transport in renal epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 264: F181-F198.
- FRÖMER, S.** (2004). Examinations of the effect of various anionic supplements on the renal excretion of macro elements and their diagnostic value with regard to the prevention of hypocalcaemic parturient paresis in dairy cows. Thesis. Free University of Berlin, Berlin, Germany.
- FRUHBECK, G.** (2006). Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J.* 393: 7-20.
- FÜRLI, M; L.J. LÄKEL, J. BAUERFELD y B. GROPPPEL** (1996). Prophylaxis of parturient paresis by means of anions rations. *Praktischer Tierarz Collegium Veterinarium.* 77: 31-34.
- GANT, R.G.; W. SANCHEZ y R.L. KINCAID** (1998). Effect of anionic salts on selenium metabolism in nonlactating, pregnant dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 81: 1637-1642.
- GARNSWORTHY, P.C.; A. LOCK, G.E. MANN, K.D. SINCLAIR y R. WEBB** (2008). Nutrition, Metabolism, and Fertility in Dairy Cows: 1. Dietary Energy Source and Ovarian Function. *J. Dairy. Sci.* 91: 3814–3823.
- GARRET, J.E.; H. TAMIR; O. KIFOR; R.T. SIMIN; K.V ROGERS; R.F. GAGEL y E.M. BROWN** (1996). Calcitonin-secreting cells of the thyroid express extracellular calcium-sensing receptor gene. *Endocrinol.* 137: 1873-1881.
- GASPERLIN, C.; T. ZADNIK, I. JAZBEC, y J. ZUST.** (2002). Effects of dietary cation-anion difference on serum calcium, phosphorus and magnesium concentration in periparturient dairy cows. *Slov. Vet. Res.* 39: 215–225.
- GAST, D.R.; R.L. HORST, N.A. JORGENSEN y H.F. DELUCA** (1979). Potential use of 1,25-dihydroxycholecalciferol for prevention of parturient paresis. *J. Dairy. Sci.* 62: 1009–1013.
- GAYNOR, P.J.; F.J. MUELLER, J.K. MILLER, N RAMSEY, J.P. GOFF y R.L. HORST** (1989). Parturient hypocalcemia in Jersey cows fed alfalfa haylagebased diets with different cation to anion ratios. *J. Dairy. Sci.* 72: 2525–2531.

- GELFERT, C.-C.; A. LÖPTIEN, N. MONTAG y R. STAUFENBIEL** (2009). Duration of the effects of anionic salts on the acid base status in cows fed different anionic salts only once daily. *Res. Vet. Sci.* 86: 529–532.
- GELFERT, C.-C.; L.M. LOEFFLER , S. FRÖMER , M. ENGEL, H. HARTMANN, K. MÄNNER, W. BAUMGARTNER y R. STAUFENBIEL** (2007). The impact of dietary cation anion difference (DCAD) on the acid-base balance and calcium metabolism of non-lactating, non-pregnant dairy cows fed equal amounts of different anionic salts. *J. Dairy Res.* 74: 311–322.
- GELFERT, C.-C.; L.M. LOEFFLER, S. FRÖMER, M. ENGEL, K. MÄNNER y R. STAUFENBIEL** (2010). Comparison of the impact of different anionic salts on the acid–base status and calcium metabolism in non-lactating, non-pregnant dairy cows. *Vet.J.* 185: 305-309.
- GELFERT, C.-C; M. ZARRATH, S. EUSTERMANN y R. STAUFENBIEL** (2004). Monitoring the use of acidogenic salts in dairy cow herd by analysis of feed and urine. *Praktischer Tierarzt.* 85: 422–430.
- GELFERT, C.-C. y R. STAUFENBIEL** (2008). The role of dietary calcium in the use of anionic salts to prevent parturient paresis in dairy cows. *Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift.* 121: 256–262.
- GOETSCH A.L. y F.N. OWENS** (1985). Effects of calcium source and level of digestion and calcium levels in the digestive tract of cattle fed high-concentrate diets. *J. Anim. Sci.* 57: 503–510.
- GOFF, J.P.** (1999). Treatment of calcium, phosphorus and magnesium balance disorders. *Vet. Clin. North. Am. Food. Pract.* 15: 619–639.
- GOFF, J.P.** (2000). Pathophysiology of calcium and phosphorus disorders. *Vet. Clin. North. Am. Food. Pract.* 16: 319-337.
- GOFF, J.P.** (2004). Macromineral disorders of the transition cow. *Vet. Clin. North. Am. Food. Pract.* 20: 471–494.
- GOFF, J.P.** (2006). Macromineral physiology and application to the feeding of the dairy cow for prevention of milk fever and other periparturient mineral disorders. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 126: 237–257.

- GOFF, J.P.** (2007). The etiology and prevention of milk fever and subclinical hypocalcaemia. In: Proceedings of 13th International Conference Production diseases in farm animals. Leipzig, 29.07.–04.08.2007, pp. 247–258.
- GOFF, J.P.** (2008). The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *Vet. J.* 176: 50–57.
- GOFF, J.P.; E.T. LITTLEDIKE y R.L. HORST** (1986). Effect of synthetic bovine parathyroid hormone in dairy cows: prevention of hypocalcemic paresis. *J. Dairy. Sci.* 69: 2278-2289.
- GOFF, J.P.; M.P. KEHRLI y R.L. HORST** (1989). Periparturient hypocalcemia in cows: prevention using intramuscular parathyroid hormone. *J. Dairy. Sci.* 72: 1182-1187.
- GOFF, J.P. y R.L. HORST** (1990). Effect of subcutaneously released 24F-1,25-dihydroxyvitamin D3 on incidence of parturient paresis in dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 73: 406-412.
- GOFF, J P y R.L. HORST** (1993). Oral administration of calcium salts for treatment of hypocalcemia in cattle. *J. Dairy. Sci.* 76: 101-108.
- GOFF, J.P. y R.L. HORST** (1994). Calcium salts for treating hypocalcemia: carrier effects, acid-base balance, and oral versus rectal administration. *J. Dairy. Sci.* 77: 1451-1456.
- GOFF, J.P. y R.L. HORST** (1997). Effects of the addition of potassium or sodium, but not calcium, to prepartum rations on milk fever in dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 80: 176-186.
- GOFF, J.P. y R.L. HORST** (1998). Use of hydrochloric acid as a source of anions for prevention of milk fever. *J. Dairy. Sci.* 81: 284-288.
- GOFF, J.P. y R.L. HORST** (2003a). Milk Fever Control in the United States. *Acta. Vet. Scand. Suppl.* 97: 145-147.
- GOFF, J.P. y R.L. HORST.** (2003b). Role of acid-base physiology on the pathogenesis of parturient hypocalcemia (milk fever)—The DCAD theory in principle and practice. *Acta. Vet. Scand. Suppl.* 97: 1–66.

- GOFF, J.P.; R.L. HORST, C. JARDON, C. BORELLI y J. WEDAM** (1996). Field trials of an oral calcium propionate paste as an aid to prevent milk fever in periparturient dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 79: 378-383.
- GOFF, J.P.; R.L. HORST, D.C. BEITZ y E.T. LITTLEDIKE** (1988). Use of 24-F-1,25-dihydroxyvitamin D₃ to prevent parturient paresis in dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 71: 1211-1219.
- GOFF, J.P.; R.L. HORST, F.J. MUELLER, J.K. MILLER, G.A. KIESS y H.H. DOWLEN** (1991). Addition of chloride to a prepartal diet high in cations increases 1,25-dihydroxyvitamin D response to hypocalcemia preventing milk fever. *J. Dairy. Sci.* 74: 3863-3871.
- GOFF, J.P.; R. RUIZ y R.L. HORST** (2004). Relative acidifying activity of anionic salts commonly used to prevent milk fever. *J. Dairy. Sci.* 87: 1245–1255.
- GOFF, J.P.; T.A. REINHART y R.L. HORST** (1995). Milk fever and dietary cation anion balance effects on concentration of vitamin D receptor in tissue of periparturient dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 78: 2388-2394.
- GOINGS, R.L.; N.L. JACOBSON, D.C. BEITZ, E.T. LITTLEDIKE, K.D. WIGGERS** (1974). Prevention of parturient paresis by a prepartum, calcium-deficient diet. *J. Dairy. Sci.* 57: 1184–1188.
- GRABHERR, H.; M. SPOLDERS, M. FURLL y G. FLACHOWSKY** (2009). Effect of several doses of zeolite A on feed intake, energy metabolism and on mineral metabolism in dairy cows around calving. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 93: 221–236.
- GRECO, D. y G.H. STABENFELDT** (1999). Glándulas endocrinas y su función. En: "Fisiología veterinaria". Cunningham, J.G., Ed., McGraw-Hill, México D.F., pp. 456-499.
- GREEN, H.B.; R.L. HORST, D.C. BEITZ y E.T. LITTLEDIKE** (1981). Vitamin D metabolites in plasma of cows fed a prepartum low calcium diet for prevention of parturient hypocalcemia. *J. Dairy. Sci.* 64: 217–226.
- GREENE, L.W.; K.E. WEBB y J.P. FONTENOT** (1983a). Effect of potassium level on site of absorption of magnesium and other macroelements in sheep. *J. Anim. Sci.* 56: 1214–1221.

- GREENE, L.W.; J.P. FONTENOT y K.E. WEBB** (1983b). Site of magnesium and other macromineral absorption in steers fed high levels of potassium. *J. Anim. Sci.* 57: 503–510.
- GREENE, L.W.; B.J MAY, G.T. SCHELLING y F.M. BYERS** (1988). Site and extent of apparent magnesium and calcium absorption in steers fed monensin. *J. Anim. Sci.* 66: 2987–2991.
- GRÜNBERG, W.; S.S. DONKIN y P.D. CONSTABLE** (2011). Periparturient effects of feeding a low dietary cation-anion difference diet on acid-base, calcium, and phosphorus homeostasis and on intravenous glucose tolerance test in high-producing dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 94: 727–745.
- GUARD, CL;** (1996). Fresh cow problems are costly: Cullinghurts the most. *Hoard's Dairyman.* 141: 8.
- GULAY, M.S.; M.J. HAYEN, M. LIBONI, T.I. BELLOSO, C.J. WILCOX y H.H. HEAD.** (2004). Low doses of bovine somatotropin during the transition period and early lactation improves milk yield, efficiency of production, and other physiological responses of Holstein cows. *J. Dairy. Sci.* 87: 948-960.
- GUYTON, AC y J.E. HALL** (2006a). Hormona paratiroidea, calcitonina, metabolismo del calcio y el fosfato, vitamina D, huesos y dientes. En: Guyton, AC y Hall, JE. "Tratado de Fisiología Médica". Undécima edición. Madrid: Elsevier, pp. 978-995.
- GUYTON, A.C. y J.E. HALL** (2006b). Excitación del músculo esquelético: transmisión neuromuscular y acoplamiento excitación contracción. En: Guyton, AC y Hall, JE. "Tratado de Fisiología Médica". Undécima edición. Madrid: Elsevier, pp. 85-90.
- GUYTON, A.C. y J.E. HALL** (2006c). Hemostasia y coagulación sanguínea. En: Guyton, AC y Hall, JE. "Tratado de Fisiología Médica". Undécima edición. Madrid: Elsevier, pp. 457-467.
- GUYTON, A.C. y J.E. HALL** (2006d). Hormonas corticosuprarrenales. En: Guyton, AC y Hall, JE. "Tratado de Fisiología Médica". Undécima edición. Madrid: Elsevier, pp. 944-959.
- HABENER, J.F.; M. ROSENBLATT y J.T. POTTS** (1984). Parathyroid hormone: Biochemical aspects of biosynthesis, secretion, action, and metabolism. *Physiol. Rev.* 64: 985-982.

- HACHENBERG, S.; C. WEINKAUF, S. HISS y H. SAUERWEIN** (2007). Evaluation of classification modes potentially suitable to identify metabolic stress in healthy dairy cows during the peripartal period. *J. Anim. Sci.* 85: 1923-1932.
- HANNAFORD, M. C.; L.A. LEITER, R.G. JOSSE, M.B. GOLDSTEIN, E.B. MARLISS y M.L. HALPERIN** (1982). Protein wasting due to acidosis of prolonged fasting. *Am. J. Physiol.* 243: E251–E256.
- HARDY, R. y M.S. COOPER** (2009). Bone loss in inflammatory disorders. *J. Endocrinol.* 201: 309–320.
- HARTMANN, H. y C. BANDT** (2000). Pathophysiologische Mechanismen der Kalzium- und Magnesiumhomöostase sowie Bedeutung der renalen Exkretion für die Diagnostik von Elektrolytimbalancen beim Rind. *Tierärztliche Praxis.* 28: 190–198.
- HAUSSER, M.R.; P.W. JURUTKA, I.C. HSIEH, P.D. THOMPSON, S.H. SEZNICK, C.A. ILAUSSER y G.K. WHITFIELD** (1995). New understanding of the molecular mechanism of receptor-mediated genomic actions of the vitamin D hormone. *Bone.* 17: 33S-38S.
- HAYIRLI, A.; R.R. GRUMMER, E.V. NORDHEIM y P.M. CRUMP** (2002). Animal and dietary factors affecting feed intake during the prefresh transition period in Holsteins. *J. Dairy. Sci.* 85: 3430–3443.
- HAYIRLI, A.; R.R. GRUMMER, E.V. NORDHEIM y P.M. CRUMP** (2003). Model for predicting dry matter intake of holsteins during the prefresh transition period. *J. Dairy. Sci.* 86: 1771–1779.
- HENRY, B.A. y I.J. CLARKE** (2008). Adipose tissue hormones and the regulation of food intake. *J. Neuroendocrinol.* 20: 842-849.
- HENRY, H.L.** (1997). 25 (OH)D₃ metabolism in kidney cell culture: lack of direct effect of estradiol. *Am. J. Physiol.* 240: E119-E124.
- HERNANDEZ, J.; C.A. RISCO y J.B. ELLIOT** (1999). Effect of oral administration of a calcium chloride gel on blood mineral concentrations, parturient disorders, reproductive performance and milk production of dairy cows with retained fetal membranes. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 215: 72-76.

- HERON, V.S.; G.F. TREMBLAY y M. OBA** (2009). Timothy hays differing in dietary cation-anion difference affect the capability of dairy cows to maintain their calcium homeostasis. *J. Dairy. Sci.* 92: 238–246.
- HERSOM, M.J.; G.R. HANSEN y J.D. ARTHINGTON** (2010). Effect of dietary cation-anion difference on measures of acid-base physiology and performance in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 88: 374-382.
- HIBBS, J.W.; W.D. POUNDEN y W.E. KRAUSS** (1947). Further studies on the effect of vitamin D and of parathyroid extract, “Paroidin”, on the blood changes of normal and milk-fever cows at parturition. *J. Dairy. Sci.* 30: 564-570.
- HIBBS, J.W. y W.D. POUNDEN** (1955). Studies on milk fever in dairy cows. IV. Prevention by short-time, prepartum feeding of massive doses of vitamin D. *J. Dairy. Sci.* 38: 65-69.
- HODNETT, D.W.; N.A. JORGENSEN y H.F. DELUCA** (1992a). 1- α -hydroxvitamin D3 plus 25-hydroxyvitamin D3 reduces parturient paresis in dairy cows fed high dietary calcium. *J. Dairy. Sci.* 75: 485-491.
- HOFBAUER, L.C.; B.F. GORI, L. RIGGS, D.L. LACEY, C.R. DUNSTAN, T.C. SPELSBERG y S. KHOSLA** (1999). Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanism of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinol.* 140: 4832-4389.
- HOLICK, M.F.** (1997). Photobiology of vitamin D. En: “Vitamin D”. Feldman D., Ed., Academic Press, New York, pp. 33-40.
- HOLLIS, B.W.; H.H. DRAPER, J.H. BURTON y R.J. ETCHERS** (1981). A hormonal assessment of bovine parturient paresis: evidence for a role of oestrogen. *J. Endocrinol.* 88: 161-171.
- HOLTENIUS, K; S. AGENAS, C. DELAVAUD e Y. CHILLIARD** (2003). Effects of feeding intensity during the dry period. Part 2. Metabolic and hormonal responses. *J. Dairy. Sci.* 86: 883–91.
- HOLTENIUS, P. y K. HOLTENIUS** (2007). A model to estimate insulin sensitivity in dairy cows. *Acta. Vet. Scand.* 49: 29

- HORST, R.L.; J.P. GOFF y T.A. REINHARDT** (1990). Advancing age results in reduction of intestinal and bone 1,25 dihydroxyvitamin D receptor. *Endocrinol.* 126: 1053-1057.
- HORST, R.L.; J.P. GOFF y T.A. REINHARDT** (1994). Symposium: calcium metabolism and utilization. *J. Dairy. Sci.* 77: 1936-1951
- HORST, R.L.; J.P. GOFF y T.A. REINHARDT** (2003). Role of Vitamin D in Calcium Homeostasis and Its Use in Prevention of Bovine Periparturient Paresis. *Acta. Vet. Scand.* 97: 35-50.
- HORST, R.L.; J.P. GOFF y T.A. REINHARDT** (2005). Adapting to the transition between gestation and lactation: Differences between rat, human and dairy cow. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* 10: 141–155.
- HORST, R.H.; J.P. GOFF, T.A. REINHARDT y D.R. BUXTON** (1997). Strategies for preventing milk fever in dairy cattle. *J. Dairy. Sci.* 80: 1269–1280.
- HORST, R.L. y N.A. JORGENSEN** (1974). Effect of ammonium chloride on nitrogen and mineral balance in lactating and non lactating goats. *J. Dairy. Sci.* 57: 683-688.
- HORST, R.L. y N.A. JORGENSEN** (1982). Elevated plasma cortisol during induced and spontaneous hypocalcemia in ruminants. *J. Dairy. Sci.* 65: 2332-2337.
- HORST, R.L. y N.A. JORGENSEN y H.F. DELUCA** (1978). Plasma 1,25 dihydroxyvitamin D and parathyroid hormone levels paretic dairy cows. *Am. J. Physiol.* 235: E634-E637.
- HORST, R.L. y T.A. REINHARDT** (1983). Vitamin D Metabolism in Ruminants and its relevance to the periparturient cow. *J. Dairy. Sci.* 66: 661-678.
- HORST, R.L. y T.A. REINHARDT** (1997). Vitamin D metabolism. En: "Vitamin D". Feldman D., Ed., Academic Press, New York, pp. 13-31.
- HOUE, H.; S. ØSTERGAARD, T. THILSING-HANSEN, R.J. JØRGENSEN, T. LARSEN, J.T. SØRENSEN, J.F. AGGER, y J.Y. BLOM** (2001). Milk fever and subclinical hypocalcaemia—an evaluation of parameters on incidence risk, diagnosis, risk factors and biological effects as input for a decision support system for disease control. *Acta. Vet. Scand.* 42: 1–29.
- HOUSEKNECHT, K.L.; C.A. BAILE, R.L. y M.E. SPURLOCK** (1998). The biology of leptin: a review. *J. Anim. Sci.* 76: 1405–1420.

- HOVE, K. y T. KRISTIANSEN** (1984). Oral 1,25-dihydroxyvitamin D3 in prevention of milk fever. *Acta. Vet. Scand.* 25: 510-525.
- HU, W. y M.R. MURPHY** (2004). Dietary cation-anion difference effects on performance and acid-base status of lactating dairy cows: A meta-analysis. *J. Dairy. Sci.* 87: 2222–2229.
- HU, W; M.R. MURPHY, P.D. CONSTABLE Y E. BLOCK.** (2007a). Dietary Cation-Anion Difference Effects on Performance and Acid-Base Status of Dairy Cows Postpartum. *J. Dairy. Sci.* 90: 3367–3375.
- HU, W; M.R. MURPHY, P.D. CONSTABLE Y E. BLOCK** (2007b). Dietary Cation-Anion Difference and Dietary Protein Effects on Performance and Acid-Base Status of Dairy Cows in Early Lactation. *J. Dairy. Sci.* 90: 3355–3366.
- HUAN, J.N; J. LI, Y. HAN, K. CHEN, N. WU y A.Z. ZHAO** (2003). Adipocyte-selective reduction of the leptin receptors induced by antisense RNA leads to increased adiposity, dyslipidemia, and insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 278: 45638–45650.
- HUNT, E. y J.T. BLACKWELDER** (2001) Disorders of calcium metabolism. En: Large animal internal medicine. Smith, B.P., Ed., Mosby, St. Louis, pp. 1248-1254.
- HURWITZ, S.** (1996). Homeostatic control of plasma calcium concentration. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 31: 41-100.
- HURWITZ, S.; S. FISHMAN; A. BAR; M. PINES; G. RISENFELD y H. TALPAZ** (1983). Simulation of calcium homeostasis: modeling and parameter estimation. *Am. J. Physiol.* 245: R664-R672.
- HUSBAND, J.; R. VECQUERAY y M. GREEN** (2006). Calcium in transition diets and its effect on milk fever. *Vet. Rec.* 158: 22771-22772.
- IIDA, K.; S. TANIGUCHI y K. KUROKAWA** (1993). Distribution of 1,25- dihydroxyvitamin D3 receptor and 25-hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase mRNA expression along rat nephron segments. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 194: 659-664.
- INGVARTSEN, K.L. e Y.R. BOISCLAIR** (2001). Leptin and the regulation of food intake, energy homeostasis and immunity with special focus on periparturient ruminants. *Domest. Anim. Endocrinol.* 21: 215–250.

- JACKSON, H.D.; A.R. PAPPENHAGEN, G.D. GOETSCH y C.H. NOLLER** (1962). Effect of parathyroid hormone on calcium and other plasma constituents of dairy cattle near parturition. *J. Dairy. Sci.* 45: 897-901.
- JACKSON, J.A. y R.W. HEMKEN** (1994). Calcium and cation-anion balance effects on feed intake, body weight gain, and humoral response of dairy calves. *J. Dairy. Sci.* 77: 1430–1436.
- JANOVICK, N.A.; Y. R. BOISCLAIR y J. K. DRACKLEY** (2011). Prepartum dietary energy intake affects metabolism and health during the periparturient period in primiparous and multiparous Holstein cows. *J. Dairy. Sci.* 94: 1385–1400.
- JARDON, P.W.** (1995). Using urine pH to monitor anionic salt programs. *Comp. Cont. Vet. Edu.* 6: 860-862.
- JESCHKE, C; G. FLACHOWSKY ,P. LEBZIEN , K. FAILING , G. BREVES y B SCHRODER** (2002). Calcium net absorption from different segments of the gastrointestinal tract differs with respect to daily calcium intake in dairy cows. *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology.* 11: 101.
- JONES G.** (2008). Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.* 88: 582S–586S.
- JONSSON, G. y B. PEHRSON** (1970). Trials with prophylactic treatment of parturient paresis. *Vet. Rec.* 87: 575-578.
- JORGENSEN, R.J.; N.R. NYENGAARD; S. HARA; J.M. ENEMARK y P.H. ANDERSEN** (1998). Rumen motility during induced hyper and hypocalcaemia. *Acta. Vet. Scand.* 39: 331-338.
- JOYCE, P.W.; W.K. SÁNCHEZ y J.P. GOFF** (1997). Effect of anionic salts in prepartum diets based on alfalfa. *J. Dairy. Sci.* 80: 2866-2875.
- JULIEN, W.E.; H.R. CONRAD, J.W. HIBBS y W.L. CRIST** (1977). Milk fever in dairy cows. viii. Effect of injected vitamin D3 and calcium and phosphorus intake on incidence. *J. Dairy. Sci.* 60: 431–436.
- KADOKAWA, H; D. BLACHE y G.B. MARTIN** (2006a). Plasma Leptin Concentrations correlate with luteinizing hormone secretion in early postpartum holstein cows. *J. Dairy. Sci.* 89: 3020–3027.

- KADOKAWA, H; D. BLACHE, Y. YAMADA y G.B. MARTIN** (2000). Relationships between changes in plasma concentrations of leptin before and after parturition and the timing of first postpartum ovulation in high-producing Holstein dairy cows. *Reprod. Fertil. Dev.* 12: 405–411.
- KADOKAWA, H. y G.B. MARTIN** (2006b). A new perspective on management of reproduction in dairy cows: the need for detailed metabolic information, an improved selection index and extended lactation. *J. Reprod. Dev.* 52: 161-168.
- KOGAWA, M.; D. M. FINDLAY, P. H. ANDERSON, R. ORMSBY, C. VINCENT, H. A. MORRIS y G. J. ATKINS** (2010). Osteoclastic metabolism of 25(OH)-vitamin D3: A potential mechanism for optimization of bone resorption. *Endocrinol.* 151: 4613–4625.
- KAHN, C.R.** (1978). Insulin resistance, insulin insensitivity, and insulin unresponsiveness: a necessary distinction. *Metabolism.* 27: 1893-1902.
- KANDYLIS, K. y A.C. BRAY** (1987). Effects of variation of dietary sulfur on movement of sulphur in sheep rumen. *J. Dairy. Sci.* 70: 40–49.
- KARABACH, U** (1992). Paracellular calcium transport across the small intestine. *J. Nutr.* 122: 672-677.
- KATSOULOS, P.D.; N. ROUBIES, N. PANOUSIS, G. ARSENOS, E. CHRISTAKI y H. KARATZIAS** (2005). Effects of long-term dietary supplementation with clinoptilolite on incidence of parturient paresis and serum concentrations of total calcium, phosphate, magnesium, potassium and sodium in dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 66: 2081–2085.
- KEISLER, D. H.; J.A. DANIEL y C.D. MORRISON** (1999). The role of leptin in nutritional status and reproductive function. *J. Reprod. Fertil.* 54: 425–435.
- KERESTES, M.; V. FAIGL, M. KULCSÁR, O. BALOGH, J. FÖLDI, H. FÉBEL, Y. CHILLIARD y G. HUSZENICZA** (2009). Periparturient insulin secretion and whole-body insulin responsiveness in dairy cows showing various forms of ketone pattern with or without puerperal metritis. *Dom. Anim. Endocrinol.* 37: 250–261.
- KERSHAW, E.E. y J.S. FLIER** (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89: 2548–56.

- KERTZ, A.F.; L.F. REUTZEL y G.M. THOMSON** (1991). Dry matter intake from parturition to midlactation. *J. Dairy. Sci.* 74: 2290–2295.
- KESSEL, S.; M. STROEHL, H.H.D. MEYER, S. HISS, H. SAUERWEIN, F.J. SCHWARZ y R. M. BRUCKMAIER** (2008). Individual variability in physiological adaptation to metabolic stress during early lactation in dairy cows kept under equal conditions. *J. Anim. Sci.* 86: 2903–2912.
- KHORASANI, G.R. y D.G. ARMSTRONG DG** (1992). Calcium, phosphorus, and magnesium absorption and secretion in the bovine digestive tract as influenced by dietary concentrations of these elements. *Livest. Prod. Sci.* 31: 271–286.
- KHORASANI, G.R.; R.A. JANZEN , W.B. MCGILL y J.J. KENNEL** (1997). Site and extent of mineral absorption in lactating cows fed whole-crop cereal grain silage of alfalfa silage. *J. Anim. Sci.* 75: 239–248.
- KICHURA, T. S.; R.L. HORST, D.C. BEITZ, y E.T. LITLEDIKE** (1982). Relationship between peripartal dietary calcium and phosphorus, vitamin D metabolism, and parturient paresis in dairy cows. *J. Nutr.* 112: 480–487.
- KNEPPER, M.A. y M.B. BURG** (1988). Renal acid-base transport. En: “Diseases of the kidney”. Schrier, R.W. y C.W. Gottschalk, Eds., Little and Brown Co., San Diego, pp. 211-239.
- KOCALAGLI, N.; J.L. RIOND; U.E. SPICHIGER y M. WANNER** (1995). Parathyroid hormone related protein and calcium homeostasis during the periparturient period of dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 56: 380-385.
- KOKKONEN, T; J. TAPONEN, S. ALASUUTARI, M. NOUSIAINEN, T. ANTTILA y L. SYRJALA-QVIST** (2002). Plasma leptin in transition dairy cows. Effects of body fatness, ambient temperature and dietary factors. In: Proceedings of the British Society of Animal Science Annual Meeting, pp. 92.
- KOKKONEN, T.; J. TAPONEN, T. ANTTILA, L. SYRJALA-QVIST, C. DELAUAUD, Y. CHILLIARD, M. TUORI y A.T. TESFA** (2005). Effect of body fatness and glucogenic supplement on lipid and protein mobilization and plasma leptin in dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 88: 1127–1141.
- KONIGSSON, K; G. SAVOINI, N GOVONI, G. INVERNIZZI, A. PRANDI, H. KINDAHL Y M.C. VERONESI** (2008). Energy balance, leptin, NEFA and IGF-I plasma

concentrations and resumption of post partum ovarian activity in swedish red and white breed cows. *Acta. Vet. Scand.* 50: 3.

KONNER, A.C., T. KLOCKENER y J.C. BRUNING (2009). Control of energy homeostasis by insulin and leptin: targeting the arcuate nucleus and beyond. *Physiol Behav.* 97: 632-638.

KUMAR, R. (1997). Vitamin D and the kidney. En: "Vitamin D". Feldman D., Ed., Academic Press, New York, pp. 273-292.

KUROSAKI N.; O YAMATO, F MORI, S. IMOTO e Y. MAEDE (2007). Preventive effect of mildly altering dietary cation-anion difference on milk fever in dairy cows. *J. Vet. Med. Sci.* 69: 185-192.

KUROSE, Y; J. IQBAL, A. RAO, Y. MURATA, Y. HASEGAWA, Y TERASHIMA, M. KOJIMA, K. KANGAWA y I.J. CLARKE (2005). Changes in expression of the genes for the leptin receptor and the growth hormone-releasing peptide/ghrelin receptor in the hypothalamic arcuate nucleus with long-term manipulation of adiposity by dietary means. *J. Neuroendocrinol.* 17: 331-340.

LAARVELD, B.; D.A. CHRISTENSEN y R.P. BROCKMAN (1981). The effect of insulin on net metabolism of glucose and amino acids by the bovine mammary gland. *Endocrinol.* 108: 2217-2221.

LAPPETELÄINEN, R.; E. LAPPETELÄINEN; T. HACINEN; M. HAHN; A. PIERSKANEN y P.H. MÄENPÄÄ (1993). Biochemical indicators of bone metabolic activity in bovine periparturient hypocalcemia. *J. Vet. Med. A.* 40: 67-72.

LARSON, B.L. y K.A. KENDALL (1957). Changes in specific blood serum protein levels associated with parturition in the bovine. *J. Dairy. Sci.* 40: 659-666.

LAW, F.M.K.; P.J. MOATE y D.D. LEAVER (1991). Parathyroid hormone-related protein in milk and its correlation with bovine milk calcium. *J. Endocrinol.* 128: 21-26.

LEAN, I.J.; P.J. DEGARIS , D.M MCNEIL y E. BLOCK (2006). Hypocalcemia in dairy cows: meta-analysis and dietary cation anion difference theory revisited. *J. Dairy. Sci.* 89: 669-684.

- LEAN, I.J.; P.J. DEGARIS, L.K. WADE y Z.K. RAJCZYK** (2003). Transition management of dairy cows. In: Proceedings of the Australian & New Zealand Combined Dairy Veterinarians Conference. Taupo, New Zealand, pp. 221–248.
- LEBLANC, S.** (2010). Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *J. Reprod. Dev.* 56: S29-S35.
- LECLERC, H. y E. BLOCK** (1989). Effects of reducing cation-anion balance for prepartum dairy cows with specific reference to hypocalcemic parturient paresis *Can. J. Anim. Sci.* 69: 41-48.
- LEURY, B.J.; L.H. BAUMGARD, S.S. BLOCK, N. SEGOALE, R.A. EHRHARDT y R. P. RHOADS** (2003). Effect of insulin and growth hormone on plasma leptin in periparturient dairy cows. *Am J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285: R1107–R1115.
- LI, F.C.; H.F. LIU y Z.H. WANG** (2008). Effects of dietary cation–anion difference on calcium, nitrogen metabolism and relative blood traits of dry Holstein cows. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 142: 185–191.
- LIEFERS S.C.; R.F. VEERKAMP, M.F.W. TE PAS, Y. CHILLIARD y T. VAN DER LENDE** (2003). Leptin concentrations in relation to energy balance, milk yield, intake, live weight, and estrus in dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 86: 799–807.
- LIEFERS S.C.; R.F. VEERKAMP, M.F.W. TE PAS, Y. CHILLIARD y T. VAN DER LENDE** (2005). Genetics and physiology of leptin in periparturient dairy cows. *Dom. Anim. Endocrinol.* 29: 227–238.
- LIESEGANG, A.** (2008). Influence of anionic salts on bone metabolism in periparturient dairy goats and sheep. *J. Dairy. Sci.* 91: 2449–2460.
- LIESEGANG, A.; C. CHIAPPI, J. RISTELI, J. KESSLER y H. D. HESS** (2007). Influence of different calcium contents in diets supplemented with anionic salts on bone metabolism in periparturient dairy cows. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 91: 120–129.
- LITLEDIKE, E.T.; J.A. STUEDEMANN, S.R. WILKINSON y R.L. HORST** (1983). Grass tetany syndrome. In: Fontenot, J.P., Bunce, G.E., Webb, Jr., K.E., Allen, V. (Eds.), Proceedings of John Lee Pratt International Symposium on the Role of Magnesium in Animal Nutrition. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, VA, USA, pp.173.

- LITTLEDIKE, E.T. y R.L. HORST** (1982). Vitamin D3 toxicity in dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 65: 749-759.
- LÖFFLER, L.M.** (2004). Influence of intraruminal administration of anionic salts on systemic acid–base balance (Hernderson–Hasselbach equation, Stewart’s strong ion model) in cattle. Thesis. Free University of Berlin, Berlin, Germany.
- LOMBA, F.; G. CHAUVAUX, E. TELLER, L. LENGELS y V. BIENFET** (1978). Calcium digestibility in cows as influenced by the excess of alkaline ions over stable acid ions in their diets. *Br. J. Nutr.* 39: 425-429.
- LUCY, M.C.** (2003). Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows. *Reproduction.* 61: 415–427.
- LUCY, M.C.** (2008). Functional differences in the growth hormone and insulin-like growth factor axis in cattle and pigs: implications for post-partum nutrition and reproduction. *Reprod. Dom. Anim.* 43: 31–39.
- MACISAAC, R.J.; I.W. CAPLE y J.A. DANKS** (1991). Ontogeny of parathyroid hormone-related protein in the ovine parathyroid gland. *Endocrinol.* 129: 757-764.
- MANOLAGAS, S.C Y R.S WEINSTEIN** (1999). New developments in the pathogenesis and treatment of steroid-induced osteoporosis. *J. B. Miner. Res.* 14: 1061–1066.
- MARGETIC, S.; C. GAZZOLA, G.G. PEGG y R.A. HILL** (2002). Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 26: 1407–33.
- MARIE, M; P.A. FINDLAY, L. THOMAS y C.L. ADAM** (2001). Daily patterns of plasma leptin in sheep: effects of photoperiod and food intake. *J. Endocrinol.* 170: 277–286.
- MARTENS, H. y G. GABEL** (1986). Pathogenesis and prevention of grass tetany from the physiologic viewpoint. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift.* 93: 170.
- MARTENS, H. e Y RAYSSIGUIER** (1980). Magnesium metabolism and hypomagnesemia. In: Ruckebusch, Y., Thivend, P. (Eds.), *Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants*. MTP Press Ltd., Lancaster, England, pp. 447–466.
- MARTENS, H. y M. SCHWEIGEL** (2000). Pathophysiology of grass tetany and other hypomagnesemias. Implications for clinical management. *Vet. Clin. North. Am. Food. Pract.* 16: 339–368.

- MARTIN, K.J.; J.J. FREITAG; E. BELLORIN-FONT; M.B. CONRADES; S. KHLAR y E. SLATOPOLSKY** (1980). The effect of acute acidosis on the uptake of parathyroid hormone and the production of adenosine 3', 5'-monophosphate by isolated perfused bone. *Endocrinol.* 106: 1607-1611.
- MARTÍN-TERESO, J.; A. GONZALEZ, H. VAN LAAR, C. BURBANO, M.M. PEDROSA, K. MULDER, L.A. DEN HARTOG, y M.W.A. VERSTEGEN.** (2009). In situ ruminal degradation of phytic acid in formaldehyde-treated rice bran. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 152: 286–297.
- MARTÍN-TERESO, J.; H. MARTENS y C. DEINER.** (2010b) Effect of Rumen Protected Rice Bran on Serum Ca of Multiparous Dairy Cows at Calving. 14th international Conference of Production Diseases in Farm Animals, Ghent 2010. Zelzate, Belgium: University Press.
- MARTÍN-TERESO, J.; M. DERKS, H. VAN LAAR, K. MULDER, L.A. DEN HARTOG y M. W.A. VERSTEGEN** (2010a) Urinary calcium excretion in non-lactating dairy cows in relation to intake of fat-coated rice bran. *J Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 94: 129–136.
- MARTÍN-TERESO, J. y M.W.A. VERSTEGEN** (2011). A novel model to explain dietary factors affecting hypocalcaemia in dairy cattle. *Nutr. Res. Rev.* 24: 228-243.
- MARTÍN-TERESO, J.; R. VAN PUIJENBROEK y H. VAN LAAR, L.A. DEN HARTOG y M.W.A. VERSTEGEN.** (2011). Effect of feeding rumen protected rice bran on calcium homeostasis of non-lactating multiparous cows. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 95: 236–244.
- MAY, R.C.; R.A. KELLY y W.E. MITCH** (1986). Metabolic acidosis stimulates protein degradation in rat muscle by a glucocorticoid-dependent mechanism. *J. Clin. Invest.* 77: 614-621.
- MCLENNAN, M.W. y R.A. WILLOUGH** (1973). Observation of serum protein values of cows during estrus, lactation and milk fever. *Can. Vet. J.* 14: 233–242.
- MCNEILL, D.M.; J.R. ROCHE, B.P. MCLACHLAN y C.R. STOCKDALE** (2002). Nutritional strategies for the prevention of hypocalcaemia at calving for dairy cows in pasture-based systems. *Aus. J. Agric. Res.* 53: 755–770.

- MEIKLE, A; M. KULCSAR, Y. CHILLIARD, H. FEBEL, C. DELAUAUD, D. CAVESTANY y P. CHILIBROSTE** (2004). Effects of parity and body condition at parturition on endocrine and reproductive parameters of the cow. *Reproduction*.127: 727–737.
- MELENDEZ, P.; G.A. DONOVAN, C.A. RISCO, M.B. HALL, R LITTELL, y J.P. GOFF** (2002). Metabolic responses of transition Holstein cows fed anionic salts and supplemented at calving with calcium and energy. *J. Dairy. Sci.* 85: 1085–1092.
- MELENDEZ, P.; G.A. DONOVAN, C.A. RISCO, R LITTELL, y J.P. GOFF,** (2003).Effect of calcium-energy supplements on calving-related disorders, fertility and milk yield during the transition period in cows fed anionic diets. *Theriogenology*. 60: 843–854
- MOATE, P.J.; K.M. SCHNEIDER; D.D. LEAVER y D.C. MORRIS** (1987). Effect of 1,25 dihydroxyvitamin D3 on the calcium and magnesium metabolism of lactating cows. *Aust. Vet. J.* 64: 73-75.
- MOORE, C.W.** (1970). Ionized calcium in normal ultrafiltrates and whole blood determined by ion exchange electrodes. *J. Clin. Invest.* 49: 318-325.
- MOORE, S.J.; M.J. VANDEHAAR, B.K. SHARMA, T.E. PILBEAM, D.K. BEEDE, H.F. BUCHOLTZ, J.S. LIESMAN, R.L. HORST y J. P. GOFF** (2000). Effects of altering dietary cation-anion difference on calcium and energy metabolism in peripartum cows. *J. Dairy. Sci.* 83: 2095–2104.
- MORRISSEY, J.J. y D.N. COHN** (1978). The effects of calcium and magnesium on the secretion of parathormone and parathyroid secretory protein by isolated porcine parathyroid cells. *Endocrinol.* 103: 2081-2090.
- MUHLHAUSLER, B.S.; C.T. ROBERTS, B.S. YUEN, E. MARROCCO, H. BUDGE y M.E. SYMONDS** (2003). Determinants of fetal leptin synthesis, fat mass, and circulating leptin concentrations in well-nourished ewes in late pregnancy. *Endocrinol.* 144: 4947–4954.
- MULLIGAN, F.J.; L. O´GRADY, D.A. RICE y M.L. DOHERTY** (2006). A herd health approach to dairy cow nutrition and production diseases of transition cow. *Anim.Reprod. Sci.* 96: 331-353.
- MULLIGAN, F.J. y M.L. DOHERTY** (2008). Production diseases of the transition cow. *Vet. J.* 176: 3–9.

- MUNSON, P.L. y P.F. HIRSCH** (1992). Importance of calcitonin in physiology, clinical pharmacology and medicine. *Bone. Miner.* 16: 162-165.
- MURRAY, R. D.; J.E. HORSFIELD, W.D. MC CORMICK, H.J WILLIAMS, y D. WARD** (2008). Historical and current perspectives on the treatment, control and pathogenesis of milk fever in dairy cattle. *Vet. Rec.* 163: 561-565.
- NAGODE, L.A. y D.J. CHEW** (1992). Nephrocalcinosis caused by hyperparathyroidism in progression of renal failure: Treatment with calcitriol. *Semin. Vet. Med. Surg. Small. Anim.* 7: 202-220.
- NAKAO, T. y E. GRUNERT** (1990). Adrenocortical function in cows with the downer syndrome. *J. Vet. Med. A.* 37: 610-613.
- NAPPERT, G. y J.M. NAYLOR** (2001). A comparison of pH determination methods in food animal practice. *Can. Vet. J.* 42: 364-367.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL** (1985). Nutrient requirements of Sheep. National Academic Press, Washington.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL** (1989). Nutrient requirements of dairy cattle. Sixth revised edition. Update 1989. National Research Council. National Academic Press. Washington, D.C. 1988.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL** (2001). Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. National Academic Press, Washington, DC.
- NEMETH, E. F. y A. SCARPA** (1987). Rapid mobilization of cellular Ca^{2+} in bovine parathyroid cells evoked by extracellular divalent cations: evidence for a cell surface calcium receptor. *J. Biol. Chem.* 262: 5188-5196.
- O'CALLAGHAN, D y M.P. BOLAND** (1999). Nutritional effects on ovulation, embryo development and the establishment of pregnancy in ruminants. *Anim. Sci.* 68: 299-314.
- OETZEL, G.R** (1991). Meta-analysis of nutritional risk factors for milk fever in dairy cattle. *J. Dairy. Sci.* 74: 3900-3912.
- OETZEL, G.R** (1993). Use of anionic salts for prevention of milk fever in dairy cattle. *Comp. Cont. Vet. Edu.* 8: 1138-1147.

- OETZEL, G.R.** (1996a). Effect of calcium chloride gel treatment in dairy cows on incidence of incidence of periparturient diseases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 209: 958-962.
- OETZEL, G.R.** (1996b). Strategies for using oral calcium supplements to prevent milk fever. *Proc. Am. Assoc. Bov. Pract.* 13: 1-4.
- OETZEL, G.R.** (2000). Management of dry cows for the prevention of milk fever and other mineral disorders. *Vet. Clin. North. Am. Food. Pract.* 16: 369–386.
- OETZEL, G.R.** (2002). The dietary cation-anion difference concept in dairy cattle nutrition: possibility and pitfalls. Pages 198–208 in *Recent Developments and Perspectives in Bovine Medicine: XXII World Buiatrics Congress*. M. Kaske, H. Scholz, and M. Holtersshinken, ed. Hannover, Germany.
- OETZEL, G.R. y J.A. BARMORE** (1993). Intake of a concentrate mixture containing various anionic salts fed to pregnant, nonlactating dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 76: 1617-1623.
- OETZEL, G.R.; J.D. OLSON, C.R. CURTIS y M.J. FETTMAN** (1988). Ammonium chloride and ammonium sulfate for prevention of parturient paresis in dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 71: 3302-3309.
- OETZEL, G.R. y J.P. GOFF** (1999). Milk fever (parturient paresis) in cows, ewes and doe goats. En: "Current Veterinary Therapy 4: food animal practice". Howard, J.L. y R.A. Smith, Eds., Saunders Co., Philadelphia, pp. 215-218.
- OETZEL, G.R.; M.J. FETTMAN, D.W. HAMAR y J.D. OLSON** (1991). Screening of anionic salts for palatability, effect on acid–base-status, and urinary calcium excretion in dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 74: 965–971.
- OHKAWA, T; S. EBISUNO, M. KITAGAWA, S. MORIMOTO, Y. MIYAZAKI y S. YASUKAWA.** (1984). Rice bran treatment for patients with hypercalciuric stones: experimental and clinical studies. *J. Urol.* 132: 1140–1145.
- OIKAWA, S. y G.R. OETZEL** (2006). Decreased insulin response in dairy cows following a four-day fast to induce hepatic lipidosis. *J. Dairy. Sci.* 89: 2999–3005.
- OKURA, N.; N. YAMAGISHI, Y. NAITO y M. KOIWA** (2007). Dose response to vaginal administration of 1,25dihydroxyvitamin D3 to cows. *Vet. J.* 174: 203–205

- ØSTERGAARD, S.; J.T. SØRENSEN, J. HINDHEDE y H. HOUE** (2004). Control strategies against milk fever in dairy herds evaluated by stochastic simulation. *Livest. Prod. Sci.* 86: 209–223.
- PALLESEN, A.; F. PALLESEN, R.J. JORGENSEN y T. THILSING** (2007). Effect of precalving zeolite, magnesium and phosphorus supplementation on periparturient serum mineral concentrations. *Vet. J.* 26: 234-239.
- PANG, P.K.; T.E. TENNER; J.A. YEE; M. YANG y H.F. JANSSEN** (1980). Hypotensive action of parathyroid hormone preparations on rats and dogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 675-678.
- PAROLA, R; E. MACCHI, D. FRACCHIA, A. SABBIONI, D. AVANZI, M. MOTTA, P. ACCORNERO y M. BARATTA** (2007). Comparison between plasma and milk levels of leptin during pregnancy and lactation in cow, a relationship with b-lactoglobulin. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 91: 240–246.
- PAYNE, J.M.** (1981). Enfermedades metabólicas de los animales domésticos. Acribia, Zaragoza.
- PEARCE, G.; D.A. TABENSKY, P.D. DELMAS, H.W. BAKER y E. SEEMAN** (1998). Corticosteroid-induced bone loss in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83: 801–806.
- PEHRSON, B.; C. SVENSSON y M. JONSSON** (1998). A comparative study of the effectiveness of calcium propionate and calcium chloride for the prevention of parturient paresis in dairy cows. *J Dairy Sci.* 81: 2011-2016.
- PEHRSON, B.; C. SVENSSON; I. GRUVAEUS y M. VIRKKI** (1999). The influence of acidic diets on the acid-base balance of dry cows and the effect of fertilization on the mineral content of grass. *J. Dairy. Sci.* 82: 1310-1316.
- PEHRSON, B.; K. HOLMSTEDT; U. JOHNSON y M. KNUTSSON** (1986). Prophylactic treatment of milk fever with ammonium chloride. En: “14 th World Congress Diseases Cattle”, Dublin, pp. 759-762.
- PELLETIER, S.; G. BELANGER, G.F. TREMBLAY, M.H. CHANTIGNY y G. ALLARD** (2008). Dietary cation anion difference and tetany index of timothy forage fertilized with liquid swine manure. *Agron. J.* 100: 213–220.

- PENNER, G.B.; G.F. TREMBLAY, T. DOW y M. OBA** (2008). Timothy hay with a low dietary cation-anion difference improves calcium homeostasis in periparturient Holstein cows. *J. Dairy. Sci.* 91: 1959–1968.
- PETRIE, L. y R.G. BREEZE** (1977). Hypervitaminosis D and metastatic pulmonary calcification in a cow. *Vet. Rec.* 101: 480–482.
- PHILIPSEN, S.** (1990). Bovikalc® kapsler Calciumklorid Aetsninger. *Dansk Vet. Tidsskrift.* 73: 653-655.
- PHILLIPPO, M.; G.W. REID y I.M. NEVISON** (1994). Parturient hypocalcaemia in dairy cows: effects of dietary acidity on plasma minerals and calciotropic hormones. *Res. Vet. Sci.* 56: 303-309.
- PIRES, J.A.A.; J.B. PESCARÉ y R.R. GRUMMER** (2007). Reduction of plasma NEFA concentration by nicotinic acid enhances the response to insulin in feed-restricted Holstein cows. *J. Dairy. Sci.* 90: 4635–4642.
- POE J.H.; L.W. GREENE; G.T. SCHELLING; F.M. BYERS y W.C. ELLIS** (1985). Effects of dietary potassium and sodium on magnesium utilization in sheep. *J. Anim. Sci.* 60: 578-582.
- PROSCAL, D.A.; W.H. OKAMURA y A.W. NORMAN** (1985). Structural requirements for the interaction of $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamin D_3 with its chick intestinal receptor system. *J. Biol. Chem.* 250: 8382-8388.
- QUAMME, C.A.** (1981). Effects of intraluminal sulfateon electrolyte transfers along the perfused the perfused rat nephron. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 59: 122-130.
- QUEEN, W.G.; G.Y. MILLER y M.A. MASTERSON** (1993). Effects of oral administration of a calcium-containing gel on serum calcium concentration in postparturient dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 202: 607-609.
- RABELO, E; S.J. BERTICS, J. MACKOVIC y R.R. GRUMMER** (2001). Strategies for increasing energy density of dry cow diets. *J. Dairy. Sci.* 84: 2240–2249.
- RAHNEMA, S.; Z. WU, O.A OHAJURUKA , W.P WEISS y D.L. PALMQUIST** (1994). Site of mineral absorption in lactating cows fed high-fat diets. *J. Anim. Sci.* 72: 229–235.
- RAM, L.; J.T. SCHONEWILLE, H. MARTENS, A.T. VAN'T KLOOSTER y A.C. BEYNEN** (1998). Magnesium absorption by wethers fed potassium bicarbonate in

combination with different dietary magnesium concentrations. *J. Dairy. Sci.* 81: 2485–2492.

RAMBERG, C.F.; D.S. KRONFELD y G.D.A. WILSON (1975). Regulation of calcium metabolism in cattle during growth, lactation and change in diet. En: "Digestion and metabolism in the ruminant". McDonald I.W y A.C.I. Warner, Eds., University New England Publications, Armidale, pp. 745-763.

RAMBERG, C.F.; J.D. FERGUSON y D.T. GALLIGAN (1996). Feeding and managing the transition cow: Metabolic basis of the cation anion difference concept. In: Proceedings of the Pennsylvania State Annual Nutrition Conference. Pennsylvania, USA, pp. 19–30.

RAMOS, J. (1995). Homeostasis cálcica en relación con el cuadro clínico y evolución de la paresia puerperal bovina. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. Facultad de Veterinaria de Lugo.

RAMOS-NIEVES, J.M.; B.J. THERING, M.R. WALDRON, P.W. JARDON y T.R. OVERTON (2009). Effects of anion supplementation to low-potassium prepartum diets on macromineral status and performance of periparturient dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 92: 5677–5691.

RASKIN, R.E.; K. A. MURRAY y J.K. LEVY (2002). Comparison of Home Monitoring Methods for Feline Urine pH Measurement. *Vet. Clin. Pathol.* 31: 51-55.

REINHARDT, T.A.; J.D. LIPPOLIS, B.J. MCCLUSKEY, J.P. GOFF, y R.L. HORST (2010). Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. *Vet. J.* 188: 122–124.

REINHARDT, T.A.; R.L. HORST y J.P. GOFF (1988). Calcium, phosphorus, and magnesium homeostasis in ruminants. *Vet. Clin. North. Am. Food. Pract.* 2: 331–350.

REIST, M; D. ERDIN, D.VON EUW, K. TSCHUEMPERLIN, H. LEUENBERGER y C. DELAUAUD (2003). Concentrate feeding strategy in lactating dairy cows: metabolic and endocrine changes with emphasis on leptin. *J. Dairy. Sci.* 86: 1690–706.

RÉRAT, M.; A. PHILIPP, H.D. HESS y A. LIESEGANG (2009). Effect of different potassium levels in hay on acid–base status and mineral balance in periparturient dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 92: 6123–6133

- RICKEN, G** (2005). Calcium transport across isolated bovine rumen epithelium. Inaugural Dissertation, School of Veterinary Medicine, Hannover, Germany.
- RINGS, M.B.; D.M. RINGS y B. WELKER** (1997). Milk fever: Seeking new solutions to an old problem. *Comp. Cont. Vet. Ed.* 19, S175-S180.
- RIOND, J.L.; A. LIESEGANG, M. WANNER, C. KAISER, M. DOBELI y H.I. JEMELKA** (1999). Effects of EDTA-induced hypocalcaemia and stress on plasma TNFalpha, Il-1-ra, G-CSF, GM-CSF and S-100 in dairy cows. *Vet. Res. Comm.* 23: 299-306.
- ROBINSON, R.S.; P.G.A. PUSHPAKUMARA, Z. CHENG, A.R. PETERS, D.R.E. ABAYASEKARA y D.D.WHATES** (2002). Effects if dietary polyunsaturated fatty acids on ovarian and uterine function in lactating dairy cows. *Reproduction.* 124: 119–131.
- ROCHE, J.R; D.E. DALLEY y F.P O'MARA** (2007). Effect of a metabolically created systemic acidosis on calcium homeostasis and the diurnal variation in urine pH in the non-lactating pregnant dairy cow. *J. Dairy Res.* 74: 34–39.
- ROCHE J.R.; D.E. DALLEY, P. MOATE, C. GRAINGER, M. RATH y F.O'MARA** (2003). A Low Dietary Cation-Anion Difference Precalving and Calcium Supplementation Postcalving Increase Plasma Calcium But Not Milk Production in a Pasture-Based System. *J. Dairy. Sci.* 86: 2658–2666.
- ROCHE, J.R.; J. MORTON, E.S. KOLVER** (2002). Sulfur and chloride play a non-acid-base role in periparturient calcium homeostasis. *J. Dairy. Sci.* 85: 3444–3453.
- ROCHE, J.R.; S. PETCH y J.K. KAY** (2005). Manipulation the dietary cation-anion difference via drenching to early-lactation dairy cows grazing pasture. *J. Dairy. Sci.* 88: 264–276.
- RODRÍGUEZ, M.** (1995). Hormonas reguladoras del calcio. En: “Fisiología Veterinaria”. García, A.; F. Castejón; L.F. De la Cruz; J. González; M.D. Murillo y G. Salido, Eds., McGraw-Hill Interamericana, Madrid, pp. 719-738.
- ROSOL T.J. y C.C. CAPEN** (1997). Pathophysiology of calcium, phosphorus and magnesium metabolism in animals. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 26: 1155-1184

- ROSOL, F.J.; D.J. CHJEW y L.A. NAGODE** (1995). Pathophysiology of calcium metabolism. *Vet. Clin. Pathol.* 24: 49-63.
- ROSOL, T.J.; D.J. CHEW; L.A. NAGODE y P. SCHENCK** (2000). Disorders of calcium. Hypercalcemia and hypocalcemia. En: "Fluid therapy in small animal practice". Dibartola, S.P., Ed., Saunders Co., Philadelphia, pp. 108-162.
- ROSS, J.G.; J.W. SPEARS y J.D. GARLICH** (1994). Dietary electrolyte balance effects on performance and metabolic characteristics in growing steers. *J. Anim. Sci.* 72: 1842-1848.
- RUDE, R.K.** (1998). Magnesium deficiency: a cause of heterogeneous disease in humans. *J. B. Miner. Res.* 13: 749-758.
- SACHS, M.; A. BAR, R. COHEN, Y. MAZUR, E. MAYER, y S. HURWITZ**, (1997). Use of 1 alpha-hydroxycholecalciferol in the prevention of bovine parturient paresis. *Am. J. Vet. Res.* 38: 2039-2041.
- SAFRANEK, R.; M. HOLECEK, J. KADLCIKOVA, L. SPRONGL, C. MISLANOVA, M. KUKAN y J. CHLADEK** (2003). Effect of acute acidosis on protein and amino acid metabolism in rats. *Clin. Nutr.* 22: 437-443.
- SAMPSON, J.D.; J.N. SPAIN, C. JONES y L. CARSTESSEN** (2009). Effects of calcium chloride and calcium sulfate in an oral bolus given as a supplement to postpartum dairy cows. *Veterinary Therapeutics* vol. 10, No. 3.
- SAMPSON, B.F.; R. MANSTON y M.J. VAGG** (1983). Magnesium and milk fever. *Vet. Rec.* 112: 447-449.
- SANDERS, J.L.; N. CHATTOPADHYAY, O. KIFOR, T. YAMAGUCHI, R.R. BUTTERS y E.M. BROWN** (2000). Extracellular calcium-sensing receptor expression and its potential role in regulating parathyroid hormone-related peptide secretion in human breast cancer cell lines. *Endocrinol.* 141: 4357-4364.
- SANSOM, B.F.; W.M. ALLEN, D.C DAVIES, M.N. HOARE, J.R. STENTON y M.J. VAGG** (1976). Use of 1 α -OH cholecalciferol in preventing postparturient hypocalcaemia and its potential value for the prevention of milk fever in dairy cows. *Vet. Rec.* 99: 310-312.

- SASSER, R.G.; P.E. FALK y R.H. ROSS** (1979). Estrogen in plasma of parturient paretic and normal cows. *J. Dairy. Sci.* 62: 551-556.
- SAUERWEIN, H.; U. HEINTGES, M. HENNIES, T. SELHORST y A. DAXENBERGER** (2004). Growth hormone induced alterations of leptin serum concentrations in dairy cows as measured by a novel enzyme immunoassay. *Livest. Prod. Sci.* 87: 189–95.
- SAUVEUR, B. y P. MONGIN** (1978). Interrelationships between dietary concentrations of sodium, potassium and chloride in laying hens. *Br. Poult. Sci.* 19: 475-485.
- SCHNEIDER, N.; A.P. TEITELBAUM y W.F. NEUMAN** (1980). Tissue deposition and metabolism of 125I-labeled synthetic amino-terminal parathyroid hormone PTH 1-34. *Calcif. Tissue Int.* 30: 147-150.
- SCHOENMAKERS, I.; NAP R.C.; J.A. MOL y H.A.W. HAZEWINKEL** (1999). Calcium metabolism: An overview of its hormonal regulation and interrelation with skeletal integrity. *Vet. Quart.* 21: 147-153.
- SCHONEWILLE, J.T.; A.T. VAN'T KLOOSTER y A.C. BEYNEN** (1994). The addition of extra calcium to a chloride- rich ration does not affect the absolute amount of calcium absorbed by non-pregnant, dry cows. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 72: 272–280.
- SCHONEWILLE, J.T.; A.T. VAN'T KLOOSTER; H. WOURTESE y A.C. BEYNEN** (1999). Hypocalcemia induced by intravenous administration of disodium ethylenediaminetetracetate and its effects on excretion of calcium in urine of cows fed a high chloride diet. *J. Dairy. Sci.* 82: 1317-1324.
- SCHRÖDER, B. y G. BREVES** (2006). Mechanisms and regulation of calcium absorption from the gastrointestinal tract in pigs and ruminants: comparative aspects with special emphasis on hypocalcemia in dairy cows. *Anim. Health. Res. Rev.* 7: 31–41.
- SEIFI, H.A.; M. MOHRI y J.K. ZADEH** (2004). Use of prepartum urine pH to predict the risk of milk fever in dairy cows. *Vet. J.* 167: 281-285.
- SEIFI, H.A.; M. MOHRI, N. FARZANEH, H. NEMATI y S.V. NEJHAD** (2010). Effects of anionic salts supplementation on blood pH and mineral status, energy metabolism, reproduction and production in transition dairy cows. *Res. Vet. Sci.* 89: 72–77.

- SELA, A.; R. KILAV y T. NAVEH-MANY** (1997). Regulation of parathyroid hormone gene expression and parathyroid cell proliferation by vitamin D, calcium and phosphate. En: "Vitamin D: chemistry, biology and the steroid hormone". Norman, A.W.; R. Bouillon y M. Thomasset, Eds., Riverside, California, pp. 260-267.
- SEOANE, J.R.; C.L. MCLAUGHLIN y C.A. BAILE** (1975). Feeding following intrahypothalamic injections of calcium and magnesium ions in sheep. *J. Dairy Sci.* 58: 349-361.
- SEVINC, M.; A. BASOGLU, H. GUZELBEKTAS y M. BOYDAK** (2003). Lipid and lipoprotein levels in dairy cows with fatty liver. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 27: 295-299.
- SIENER, R.; H. HEYNCK y A. HESSE** (2001). Calcium-binding capacities of different brans under simulated gastrointestinal pH conditions. In vitro study with ⁴⁵Ca. *J. Agric. Food. Chem.* 49: 4397-4401.
- SILVA, J.H. y M.J. RUIZ MORENO** (1998). Calcio y vitamina D. Su relación con el sistema inmunológico. Revisión bibliográfica. *Med. Vet.* 15: 15-22.
- SINGER, R.B. y A.B. HASTINGS** (1948). An improved clinical method for the estimation of disturbances of the acid-base balance of human blood. *Medicine* 27: 223-242.
- SORENSEN, A.; C.L. ADAM, P.A. FINDLAY, M. MARIE, L. THOMAS, M.T. TRAVERS y R.G. VERNON** (2002a). Leptin secretion and hypothalamic neuropeptide and receptor gene expression in sheep. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 282: R1227-1235.
- SORENSEN, J.T.; S. ØSTERGAARD, H. HOUE y J. HINDHEDE** (2002b). Expert opinions of strategies for milk fever control. *Prev. Vet. Med.* 55: 69-78.
- SPANGHERO, M.** (2004). Prediction of urinary and blood pH in non-lactating dairy cows fed anionic diets. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 116: 83-92.
- SPIEGELMAN, B.M. y J.S. FLIER** (2001). Obesity and the regulation of energy balance. *Cell.* 104: 531-43.
- STACY, B.D. y B.W. WILSON** (1970). Acidosis and hypercalciuria: Renal mechanisms affecting calcium, magnesium and sodium excretion in the sheep. *J. Physiol.* 210: 549-564.

- STAUFENBIEL, R.** (2000). Prophylaxis of parturient paresis: part 2. *Veterinarspiegel*.1: 58–61.
- STEWART, P.A** (1983). Modern quantitative acid-base chemistry. *Can. J. Physiol. Phayrmacol.* 61: 1444-1461.
- SUDA, T. y B, TAKAHASHI** (1997). Vitamin D and oostoeclastogenesis. En: "Vitamin D". Feldman D., Ed., Academic Press, New York, pp. 329-340.
- SUTTON, R.A.L.; N.L.M. WONG y J.H. DIRKS** (1979). Effects of metabolic acidosis and alkalosis on sodium and calcium transport in the dog kidney. *Kidney. Int.* 15: 520-533.
- SWENSON, M.J.** (1993). Physiological properties and cellular and chemical constituents of blood. Pages 22–48 in Duke's Physiology of Domestic Animals. 11th ed. M. J. Swenson and W. O. Reece, ed. Cornell Univ. Press, Ithaca, NY.
- TAKAGI, H. y E. BLOCK** (1991). Effects of manipulating dietary cation-anion balance on macromineral balance in sheep. *J. Dairy. Sci.* 74: 4202-4214.
- TAYLOR, N.B.; C.B. WELD y J.F. SYKES** (1934). The relation of the parathyroid glands to the action of irradiated ergosterol. Proceedings of the Royal Society (London) 116: 10-36.
- THILSING-HANSEN, T.; R.J. JØRGENSEN, J.M. ENEMARK, T. LARSEN** (2002a). The effect of zeolite A supplementation in the dry period on periparturient calcium, phosphorus and magnesium homeostasis. *J. Dairy. Sci.* 85: 1855–1862.
- THILSING-HANSEN, T.; R.J. JØRGENSEN y S. ØSTERGAARD** (2002b). Milk Fever Control Principles: A Review. *Acta. Vet. Scand.* 43: 1-19.
- THILSING, T.; T. LARSEN, R. J. JØRGENSEN y H. HOUE** (2007).The Effect of Dietary Calcium and Phosphorus Supplementation in Zeolite A Treated Dry Cows on Periparturient Calcium and Phosphorus Homeostasis. *J. Vet. Med. A.* 54: 82–91.
- THOMASSET, M.** (1997). Calbindin-D 9K. En: "Vitamin D". Feldman D., Ed., Academic Press, New York, pp. 223-232.
- THORN, S.R.; R.A. EHRHARDT, W.R. BUTLER, S.M. QUIRK e Y R. BOISCLAIR** (2008). Insulin regulates hepatic leptin receptor expression in early lactating dairy cows. Articles in PresS. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 295: R1455-62.

- TOFFALETTI, J.** (1983). Ionized calcium measurement: analytical and clinical aspects. *Lab. Manag.* 7: 31-35.
- TOKUDA, T; C. DELAUAUD e Y. CHILLIARD** (2002). Effects of dietary energy levels on plasma leptin in sheep. *J. Anim Sci.* 73: 471–478.
- TREMBLAY, G.F.; Z. NIE, G. BÉLANGER, S. PELLETIER y G. ALLARD** (2009). Predicting timothy mineral concentrations, dietary cation-anion difference, and grass tetany index by near-infrared reflectance spectroscopy. *J. Dairy. Sci.* 92: 4499–4506.
- TUCKER, W.B.; G.A. HARRISON y R.W. HEMKEN** (1988a). Influence of dietary cation-anion on milk, blood, urine, and rumen fluid in lactating dairy cattle. *J. Dairy. Sci.* 71: 346-354.
- TUCKER, W.B.; J.F. HOGUE, D.F. WATERMAN, T.S. SWENSON, Z. XIN, R.W. HEMKEN, J.A. JACKSON, G.D. ADAMS y L.J. SPICER** (1991). Role of sulfur and chloride in the dietary cation-anion balance equation for lactating dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 69: 1205-1213.
- TUCKER, W.B.; J.F. HOGUE, G.D. ADAMS., M. ASLAM, I.S. SHIN y G.MORGAN** (1992). Influence of dietary cation–anion balance during the dry period on the occurrence of parturient paresis in cows fed excess calcium. *J. Anim. Sci.* 70: 1238–1250.
- TUCKER, W.B.; Z. XIN y R.W. HEMKEN** (1988b). Influence of dietary calcium chloride on adaptive changes in acid–base status and mineral metabolism in lactating dairy cows fed a diet high in sodium bicarbonate. *J. Dairy. Sci.* 71: 1587–1597.
- TÜRCK, G. y S. LEONHARD-MAREK** (2010). Potassium and insulin affect the contractibility of abomasal smooth muscle. *J. Dairy. Sci.* 93: 3561-3658.
- TYZARD, I** (1995). *Inmunología Veterinaria*. McGraw-Hill Interamericana, México D.F.
- UNDERWOOD, E.J. y N.F. SUTTLE** (1999). *The Mineral Nutrition of Livestock*. 3rd ed. CABI Publishing, New York, NY.
- VAGNONI, D.B. y G.R. OETZEL** (1998). Effects of dietary cation–anion difference on the acid–base status of dry cows. *J. Dairy. Sci.* 81: 1643–1652.
- VALK, H.; B.J. SEBEK y A.C. BEYNEN** (2002). Influence of phosphorus intake on excretion and blood plasma and saliva concentrations of phosphorus in dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 85: 2642–2649.

- VAN DE BRAAK, A.E.; A.T. VAN'T KLOOSTER y A. MALESTEIN** (1987). Influence of a deficient supply of magnesium during the dry period on the rate of calcium mobilization by dairy cows at parturition. *Res. Vet. Sci.* 42: 101–108.
- VANDEHAAR, M.J. y N. ST-PIERRE** (2006). Major Advances in Nutrition: Relevance to the Sustainability of the Dairy Industry. *J. Dairy. Sci.* 89: 1280–1291.
- VAN DIJK, C.J. y D.C. LOURENS** (2001). Effects of anionic salts in a prepartum dairy ration on calcium metabolism. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 72: 76-80.
- VAN HOUTEN, J.; P. DANN, G MCGEOCH, E. M BROWN, K KRAPCHO, M. NEVILLE, y J. J. WYSOLMERSKI** (2004) The calcium-sensing receptor regulates mammary gland parathyroid hormone-related protein production and calcium transport. *J. Clin. Invest.* 113: 598-608.
- VAN KNEGSEL, A.T.M.; H. VAN DEN BRAND, E.A.M. GRAAT, J. DIJKSTRA, R. JORRITSMA, E. DECUYPERE, S. TAMMINGA y B. KEMP** (2007). Dietary energy source in dairy cows in early lactation: metabolites and metabolic hormones. *J. Dairy. Sci.* 90: 1477–1485.
- VAN KNEGSEL, A.T.M.; H. VAN DEN BRAND, J. DIJKSTRA, S. TAMMINGA y B. KEMP** (2005). Effect of dietary energy source on energy balance, production, metabolic disorders and reproduction in lactating dairy cattle. *Reprod. Nutr. Dev.* 45: 665–688.
- VAN MOSEL, M.; A.T. VAN'T KLOOSTER; F. VAN MOSEL y J. VAN DER KUILEN** (1993). Effects of reducing dietary (Na+K)-(Cl+SO₄) on the rate of calcium mobilization by dairy cows at parturition. *Res. Vet. Sci.* 54: 1-9.
- VAN MOSEL, M.; H.S. WOUTERSE y T.H. VAN'T KLOOSTER** (1994). Effects of reducing dietary ([Na + K]–[Cl + SO₄]) on bone in dairy cows at parturition. *Res. Vet. Sci.* 56: 270–276.
- VAN'T KLOOSTER, A.T.** (1976). Adaptation of calcium absorption from the small intestine of dairy cows to changes in the dietary calcium intake and at the onset of lactation. *Zeitschrift fur Tierphysiologie, Tierernahrung und Futtermittelkunde.* 37: 169–182.
- WANG, C. y D.K. BEEDE** (1992a). Effects of ammonium chloride and sulfate on acid–base status and calcium metabolism of dry Jersey cows. *J. Dairy. Sci.* 75: 820–828.

- WANG, C. y D.K. BEEDE** (1992b). Effects of diet magnesium on acid-base status and calcium metabolism of dry cows fed acidogenic salts. *J. Dairy. Sci.* 75: 829-836.
- WARD, D.T. y RICCARDI, D.** (2002). Renal physiology of the extracellular calcium-sensing receptor. *Pflugers Archiv: Euro. J. Physiol.* 445: 169-176.
- WASSERMAN, R.H.** (1997). Vitamin D and intestinal absorption of calcium and phosphorus. En: "Vitamin D". Feldman D., Ed., Academic Press, New York, pp. 259-273.
- WATHES, D.C.; Z. CHENG, N. BOURNE, V.J. TAYLOR, M.P. COFFEY y S. BROTHERSTONE** (2007). Differences between primiparous and multiparous dairy cows in the inter-relationships between metabolic traits, milk yield and body condition score in the periparturient period. *Dom. Anim. Endocrinol.* 33: 203–225.
- WATHES, D.C.** (2012). Mechanisms Linking Metabolic Status and Disease with Reproductive Outcome in the Dairy Cow. *Reprod. Dom. Anim.* 47: 304–312.
- WEINSTEIN, R.S.; R.L. JILKA, A.M. PARFITT y S.C. MANOLAGAS** (1998) Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J. Clin. Invest.* 102: 274–282.
- WENTINK, G.H. y V.D. TSGAM** (1992). Oral administration of calcium chloride containing products: Testing for deleterious side effects. *Vet. Quart.* 14: 76-79.
- WEST, J.W.; K.D. HAYDON, B.G. MULLINIX y T.G. DANDIFER** (1992). Cation-anion balance and cation source effects on acid-base status of heat-stressed cows. *J. Dairy. Sci.* 75: 2776-2786.
- WHITING, S.J. y D.E.C COLE** (1986). Effect of dietary anion composition on acid induced hypercalciuria in adult rat. *J. Nutr.* 116: 388-394.
- WHITING, S.J. y H.H. DRAPER** (1981). Effect of chronic acid load as sulfate or sulfur amino acids on bone metabolism in adult rats. *J. Nutr.* 111: 1721-1726.
- WIGGERS, K. D.; D.K. NELSON y N.L. JACOBSEN** (1975). Prevention of parturient paresis by a low calcium diet prepartum: A field study. *J. Dairy. Sci.* 58: 430–431.
- WILDE, D.** (2006). Influence of macro and micro minerals in the peri-parturient period on fertility in dairy cattle. *Anim.Reprod. Sci.* 96: 240–249.

- WILDMAN, C.D.; J.W. WEST y J.K. BERNARD** (2007). Effect of dietary cation-anion difference and dietary crude protein on milk yield, acid-base chemistry, and rumen fermentation. *J. Dairy. Sci.* 90: 4693–4700.
- WILKENS, M.R.; I. OBERHEIDE, B. SCHRÖDER, E. AZEM, W. STEINBERG y G. BREVES** (2012). Influence of the combination of 25-hydroxyvitamin D3 and a diet negative in cation-anion difference on peripartal calcium homeostasis of dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 95: 151–164.
- WILSON, G.** (2003) Development of a novel concept (Calcigard) for activation of calcium absorption capacity and prevention of milk fever. *Acta. Vet. Scand. Suppl.* 97: 77–82.
- WOCKENFUS, A.M.; C.D. KOCH, P.M. CONLON, L.D. SORENSEN, K.L. CAMBERN, A.J. CHIHAK, J.A. ZMOLEK, A.E. PETERSEN, B.E. BURNS, J.C. LIESKE y B.S. KARON** (2013). Discordance between urine pH measured by dipstick and pH meter: Implications for methotrexate administration protocols. *Clin. Biochem.* 46: 152–154.
- WU, W.X.; J.X. LIU, G.Z. XU y J.A. YE** (2008). Calcium homeostasis, acid–base balance, and health status in periparturient Holstein cows fed diets with low cation–anion difference. *Livest. Prod. Sci.* 117: 7–14.
- WU, W.X.; Y.M. WU y J.X. LIU** (2007). Blood profiles and health in Holstein cows fed diets with varying cation-anion difference and calcium supplementation. *J. Anim. Feed. Sci.* 16: 376-381.
- YANAGAWA, N. y D.B.N. LEE** (1992). Renal handling of calcium and phosphorus. En: "Disorders of Bone and Mineral". Coe, F.L. y M.J. Favus, Eds., Raven press, New York, pp. 3-40.
- YEN, J.T.; W.G. POND y R.L. PRIOR** (1981). Calcium chloride as a regulator of feed intake and weight gain in pigs. *J. Anim. Sci.* 52: 778-782.
- YOUNG, J.D.E.; J.S. KO y Z.A. COHN** (1984). The increase in intracellular free calcium associated with IgG 25/1 Fc receptor-ligand interactions: role in phagocytosis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 81: 5430-5434.
- YONEKURA, S; K. KITADE, G. FURUKAWA, K. TAKAHASHI, N. KATSUMATA y K. KATOH** (2002). Effects of aging and weaning on mRNA expression of leptin and

CCK receptors in the calf rumen and abomasum. *Domest. Anim. Endocrinol.* 22: 25–35.

YONEKURA, S; T. SENOO, Y. KOBAYASHI, T. YONEZAWA, K. KATOH e Y OBARA (2003). Effects of acetate and butyrate on the expression of leptin and short-form leptin receptor in bovine and rat anterior pituitary cells. *Gen. Comp. Endocrinol.* 133: 165–172.

YUEN, B.S.; P.C. OWENS, J.R. MCFARLANE, M.E. SYMONDS, L.J. EDWARDS y K.G. KAUTER (2002). Circulating leptin concentrations are positively related to leptin messenger RNA expression in the adipose tissue of fetal sheep in the pregnant ewe fed at or below maintenance energy requirements during late gestation. *Biol. Reprod.* 67: 911–916.

ZHANG, Y.; R. PROENCA, M. MAFFEI, M. BARONE, L. LEOPOLD y J. M. FRIEDMAN (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 372: 425–432.

ZIEBA, D.A; M. SZCZESNA, B. KLOCEK-GORKA y G.L. WILLIAMS (2008). Leptin as a nutritional signal regulating appetite and reproductive processes in seasonallybreeding ruminants. *J. Physiol. Pharmacol.* 59: 7-18.

ZINN, R.A. e Y SHEN (1996). Interaction of dietary calcium and supplemental fat on digestive function and growth performance in feedlot steers. *J. Anim. Sci.* 74: 2303–2309.

Resúmenes

9. RESÚMENES.

9.1. RESUMEN.

La hipocalcemia, vitularia o fiebre de la leche, es una de las patologías metabólicas más frecuentes durante el periparto en las vacas de producción láctea. A lo largo del tiempo se han diseñado distintas estrategias con el fin de evitar esta enfermedad. De entre todas ellas, la administración de sales aniónicas es una de las más recientes y de las que reciben mayor atención por ser una de las más eficaces, aunque no está exenta de limitaciones y posibles efectos secundarios.

En el presente trabajo de tesis doctoral nos planteamos como objetivo fundamental valorar la eficacia de la aplicación de sales aniónicas, como método preventivo de hipocalcemia en condiciones reales de una granja comercial en un sistema de producción semiextensivo. En nuestro estudio, además de las variaciones de las concentraciones plasmáticas de calcio y calcio iónico, hemos valorado los cambios en el equilibrio ácido-base, las variaciones de los principales minerales séricos, PTH y hormonas indicadoras del estado metabólico de los animales.

Este estudio lo llevamos a cabo en una granja comercial de vacas de leche de tamaño medio representativa de nuestra zona de trabajo. Para ello hemos seleccionado 17 vacas Holstein múltiparas, preñadas y no lactantes, que 21 días antes de la fecha prevista del parto fueron divididas de forma aleatoria en dos grupos según la dieta consumida: control (DCAD: +272,84 mEq/kg MS) y aniónica (DCAD: +59,65 mEq/kg MS). Durante el posparto todos los animales consumieron la misma dieta de lactación (DCAD: +269,44 mEq/kg MS).

La toma de muestras se realizó entre los días 21 preparto y 28 posparto siguiendo el calendario: -21d, -17d, -14d, -12d, -10d, -5d, -3d, parto, +1d, +2d, +7d, +14d, +21, +28d, para la determinación de los siguientes parámetros: estado ácido-base, concentración de minerales plasmáticos, PTH, otros parámetros séricos de interés como la leptina e insulina.

La administración de la dieta aniónica indujo desde el inicio de su aplicación hasta el posparto, una acidosis metabólica leve y asintomática para la que no hemos podido apreciar compensación respiratoria. La calcemia (tanto calcio total como iónico) durante el preparto

Resúmenes

fue inferior en el grupo aniónico y, por el contrario, durante el parto obtuvo unos valores ligeramente superiores, aunque en ambos grupos nunca observamos ningún caso de hipocalcemia (calcio >8 mg/dl en todos los animales). El resto de los minerales no estuvieron sujetos a variaciones importantes. Con respecto a la PTH, el comportamiento fue el esperado ante un descenso de la calcemia, y así apreciamos una concentración superior en el grupo aniónico. Al evaluar la concentración plasmática de leptina e insulina no observamos influencia de la dieta, por lo que las sales aniónicas no tienen efectos negativos sobre el balance energético en el posparto.

A modo de conclusión podemos afirmar que la administración de sales aniónicas durante el parto en granjas comerciales obteniendo dietas con una DCAD próxima a cero puede ser un buen método preventivo de la hipocalcemia.

9.2 SUMMARY.

Hypocalcemia or milk fever, is one of the most frequent metabolic disorders during the peripartum of dairy cows. Over time, different strategies have been developed in order to reduce the incidence of this disease. Among of them, the administration of anionic salts is one of the most recent and has received a lot of attention due to its efficacy; although this method is not free of limitations and secondary effects.

In the present thesis, our main objective was to evaluate the application of anionic salts, as a preventive method of milk fever in real conditions in a comercial farm with a production system representative of our work area. In our study, in addition to the variations in the plasma concentrations of total and ionized calcium, we have evaluated the changes in the acid-base status, the variations of the main plasma minerals, PTH and hormones of metabolic balance due to the ingestion of anionic salts

This study was developed in a medium size commercial farm which is the most common kind of farm in our workplace. We have selected 17 pregnant and not lactating Holstein multiparous cows, that 21 days prior to expected calving date were assigned randomly to two groups according to the diet: control diet (DCAD: +272,84 mEq/kg MS) and anionic diet (DCAD: +59,65 mEq/kg MS). All animals eaten the same lactation diet during the pospartum (DCAD: +269,44 mEq/kg MS).

The blood and urinary samples were collected from the 21 day prepartum to the 28 day pospartum following the timetable: -21d, -17d, -14d, -12d, -10d, -5d, -3d, parturition, +1d, +2d, +7d, +14d, +21, +28d, in order to determine the following parameters: acid-base status, plasma minerals, PTH, other interesting plasma parameters like leptin and insulin.

The administration of the anionic diet induced from the beginning of the administration to the postpartum, a mild asymptomatic metabolic acidosis without respiratory compensation. The plasma concentration of calcium (total and ionized) in the postpartum was lower in the anionic group and the opposite was observed during the peripartum with slightly higher values in the group fed with anionic diet although we have never observed a case of hypocalcemia (calcium >8 mg/dl in all animals) in both groups. The other plasma minerals did not show significant differences between the two groups. The behavior of PTH concentration was the expected according the calcaemia and we observed a higher concentration in the anionic group. The administration of anionic salts did not appear to have negative effects in

Resúmenes

the energetic balance in the postpartum with not differences in the leptin and insulin concentration between the two groups.

In conclusion, the administration of anionic salts, with a DCAD diet near zero, during the latter days of the prepartum can be a good preventive method of hypocalcemia in comercial farms of our work area.