

Efecto de la Suplementación de Calcio en Gel Vía Oral sobre la Prevalencia de Hipocalcemia y la Producción de Leche en la Lactancia Temprana de Vacas Holstein

Por
Isamari Soto Soto

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado
de

MAESTRO EN CIENCIAS
en
CIENCIA ANIMAL

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO DE MAYAGÜEZ
2016

Aprobado por:

Guillermo Ortiz Colón, Ph.D.
Miembro del Comité Graduado

Fecha

Esbal Jiménez Cabán, Ph.D.
Miembro del Comité Graduado

Fecha

Teodoro Ruíz López, Ph.D.
Presidente del Comité Graduado

Fecha

María Plaza Delestre, Ph.D.
Representante Estudios Graduados

Fecha

José R. Latorre Acevedo, Ph.D.
Director de Departamento

Fecha

ABSTRACT

The objectives of this experiment were to evaluate in dairy cows the effects of oral calcium supplementation of a post calving gel on the incidence of hypocalcemia and productive performance in early lactation. In a 2x2 factorial arrangement sixty (primiparous and multiparous) Holstein cows were assigned alternately according to calving date to the non-treatment or treatment with oral calcium gel supplementation. Cows in the latter group received a single dose of 54 g of oral calcium in 300mL of gel after calving. Cows in the control group received no calcium gel. Blood samples were collected thrice to analyze ionized calcium concentrations: at least 1 day before, immediately after and 5 days after calving. Productive performance and health events were recorded during the first 100 days and 50 days postpartum, respectively. Significant differences in blood calcium concentration were not found between treatments, but a tendency ($P= 0.10$) was observed toward a lower incidence of subclinical hypocalcemia in cows supplemented with oral calcium gel after calving. Postpartum blood calcium concentration was higher ($P= 0.03$) in primiparous than in multiparous cows. Oral calcium gel supplementation did not affect milk production ($P= 0.71$), but the interval between calving and day of peak production was shorter ($P= 0.05$). Cows in the control group presented more calving problems and were more susceptible to suffer diseases such as retained placenta, metritis and mastitis.

Keywords: hypocalcemia, calcium supplementation, milk production, health events

RESUMEN

Los objetivos de este experimento fueron evaluar en vacas lecheras los efectos de la suplementación oral de calcio en un gel después del parto, sobre la incidencia de hipocalcemia y el desempeño productivo al inicio de la lactación. En un arreglo factorial 2x2 se asignaron 60 vacas de raza Holstein primíparas y multíparas, alternando según la fecha de parto, al testigo sin tratamiento y al tratamiento de suplementación con calcio. Las vacas de este último grupo recibieron una dosis de 54g de calcio en 300mL de gel después del parto. Las vacas del grupo control no recibieron gel de calcio. Se tomaron muestras de sangre para analizar la concentración de calcio en la sangre en tres ocasiones: al menos 1 día antes, inmediatamente después y cinco días después del parto. Se recolectaron datos del comportamiento productivo y la presencia de enfermedades a los primeros 100 y 50 días posparto, respectivamente. No hubo diferencias significativas entre los tratamientos en la concentración de calcio sanguíneo, pero se observó una tendencia ($P=0.10$) hacia menor incidencia de hipocalcemia en las vacas con gel de calcio después del parto. Las concentraciones de calcio en la sangre después del parto fueron significativamente mayores ($P= 0.03$) en las vacas primíparas que en las multíparas. La suplementación con gel de calcio no afectó la producción de leche ($P= 0.71$), pero redujo el intervalo desde el parto hasta el día pico de producción ($P= 0.05$). Las vacas testigo presentaron más problemas de parto dificultoso y fueron más susceptibles de padecer enfermedades como la retención de placenta, metritis y mastitis.

Palabras claves: hipocalcemia, suplementación de calcio, producción de leche, eventos de salud

DEDICATORIA

A una persona que, aunque pequeña, tiene un gran significado en mi vida, mi motor para ser mejor persona, estudiante y madre; a mi hijo, Liam Noah Feliciano Soto, dedico este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero agradecerle a Dios por darme salud durante todos estos años para poder realizar mis estudios universitarios, y por darme la paciencia y la calma para sobrepasar todos los obstáculos que se me presentaron en el camino. Gracias a mi familia, en especial a mi padre Ramón Soto Cruz y a mi madre Annette Soto Álvarez por su apoyo incondicional, su paciencia para conmigo cuando necesitaba de su tiempo y su ayuda, y por depositar en mí la perseverancia de alcanzar mis sueños y metas. Gracias a mi novio Gilberto Feliciano Rosario por creer en mí y por apoyarme a lo largo de este arduo trabajo. A los miembros de mi comité graduado, el Dr. Teodoro Ruiz Lopez, Dr. Guillermo Ortiz Colon y el Dr. Esbal Jiménez Caban, gracias por haber sido pilares durante mi desempeño profesional, por haber sembrado en mí la semilla del conocimiento, y por haber estado para mí en todo momento. Gracias por nunca haber dicho que no y por abrir sus puertas cuando yo les necesitaba. Al Sr. Ricardo Montañés, técnico de investigaciones de la Estación Experimental Agrícola de Lajas, gracias por haberme ayudado en la toma de datos y por su interés en ayudarme a completar esta jornada. A mis amigos, compañeros, demás profesores y personal de la oficina del departamento, muchas gracias. Sin su motivación y su mano amiga, haber corrido esta carrera no hubiese sido posible.

TABLA DE CONTENIDO

1.0 INTRODUCCIÓN	1
2.0 OBJETIVOS	5
3.0 REVISIÓN DE LA LITERATURA	6
4.0 MATERIALES Y METODOS	211
4.1 Animales.....	211
4.2 Suplemento de calcio	211
4.3 Dieta	222
4.4 Toma de las muestras de sangre y su manejo.....	233
4.5 Preparación de la curva estándar	244
4.6 Preparación de las muestras	25
4.7 Análisis del suero sanguíneo para determinar concentración de calcio	255
5.0 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	266
6.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	277
7.0 CONCLUSIÓN.....	Error! Bookmark not defined. 39
8.0 ANEJOS.....	40
8.0 BIBLIOGRAFÍA	Error! Bookmark not defined. 2

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Composición química garantizada y lista de ingredientes de la gel comercial suplementada a vacas del grupo experimental (CA).....	222
Tabla 2: Densidad garantizada de nutrientes e ingredientes incluidos en alimento concentrado para vacas horras.	233
Tabla 3: Densidad garantizada de nutrientes e ingredientes incluidos en alimento concentrado para vacas próximas al parto.	233
Tabla 4: Comparación entre las medias (LSM) de las concentraciones de calcio ionizado en el plasma sanguíneo en los tres muestreos según la edad de la vaca (P o M) y tratamiento (CA o CO).....	Error! Bookmark not defined.8
Tabla 5: Comparación entre las medias (LSM) de los días de pico de producción de leche, producción de leche al día pico y producción de leche promedio a los 100 días según la edad de la vaca (P o M) y tratamiento (CA o CO).	Error! Bookmark not defined.4
Tabla 6: Incidencia de varios problemas asociados al parto según la edad de la vaca (P o M) y tratamiento (CA o CO).....	Error! Bookmark not defined.5
Tabla 7: Incidencia de retención de placenta según la edad de la vaca (P o M) y tratamiento (CA o CO).....	Error! Bookmark not defined.6
Tabla 8: Incidencia de mastitis según la edad de la vaca (P o M) y tratamiento (CA o CO)	Error! Bookmark not defined.7
Tabla 9: Incidencia de metritis según la edad de la vaca (P o M) y tratamiento (CA o CO)	Error! Bookmark not defined.7

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cambio en las concentraciones de calcio plasmático con relación a la edad de la vaca (P o M) a lo largo de los tres muestreos.....**Error! Bookmark not defined.**

Figura 2: Cambio en las concentraciones de calcio plasmático con relación al tratamiento (CA o CO) a lo largo de los tres muestreos.**Error! Bookmark not defined.**

Figura 3: Producción de leche durante la lactancia temprana según la edad de la vaca (P o M).
.....**Error! Bookmark not defined.**2

Figura 4: Producción de leche durante la lactancia temprana según el tratamiento (CA o CO).
.....**Error! Bookmark not defined.**3

1.0 INTRODUCCIÓN

La industria lechera existe en casi todos los países del mundo y es el sector agrícola que produce la leche fresca para consumo o para ser elaborada en forma de productos como el queso, la mantequilla, el yogurt, el mantecado, la chocolatina, entre otros, los cuales son excelentes proveedores de calcio. En el mundo se producen cerca de 730 millones de toneladas de leche cada año de las cuales 614 millones pertenecen a la leche bovina. En la región del Caribe, que incluyen los países de Cuba, Jamaica, Haití, República Dominicana, Puerto Rico y las Antillas Menores, se producen 1.9 millones de toneladas de este total (Galletto, 2012).

La industria lechera es la empresa agrícola de mayor importancia en Puerto Rico. La Oficina de Reglamentación de la Industria Lechera (ORIL) tiene como propósito que en Puerto Rico se produzca leche de excelente calidad que cubra la demanda local a un precio justo y razonable para el consumidor y que beneficie a todos los sectores que integran la empresa. Durante el año fiscal 2012- 2013, el ingreso bruto agrícola del país ascendió a 929.7 millones de dólares de los cuales 212.7 millones provinieron de la producción de leche. Además de ser la fuente primaria de leche y también de carne, la industria lechera constituye la fuente principal de empleos agrícolas en la isla, generando aproximadamente 25,000 empleos directos e indirectos (NA, 1999). Según el último informe publicado por la ORIL en el año 2013, en Puerto Rico operaban 320 vaquerías para la venta de leche grado A, de las cuales el 63% estaban localizadas en la región Norte del país. Durante los últimos años se ha observado una reducción anual de alrededor de 2,000 vacas lecheras en Puerto Rico (NA, 1999). Esto se debe en gran parte a la consolidación de hatos, pero también a bajas por problemas de salud y pobre

productividad. En un estudio multiestatal de hatos seleccionados para representar estadísticamente a la Industria Lechera de los Estados Unidos, el Sistema de Monitoreo Nacional de la Salud Animal clasificó las razones para las pérdidas de vacas en siete categorías, siendo los problemas de la glándula mamaria, los reproductivos y la pobre producción de leche las más importantes (Fetrow et al, 2006).

El surgimiento de las enfermedades en el ganado lechero se vuelve de gran importancia para los ganaderos cuando sus secuelas perjudiciales resultan en una disminución en la producción de leche (Oetzel, 2015). El mantenimiento del debido balance de nutrientes en el cuerpo del animal es crucial para la resistencia natural a las enfermedades, y está directamente relacionado con el mejoramiento y la maximización de la producción de leche (Aasif et al, 2008).

La hipocalcemia y su manifestación clínica conocida comúnmente como “la fiebre de leche” es una enfermedad no infecciosa de consecuencias críticas, caracterizada por un descenso brusco de los niveles de calcio en la sangre. Este desorden metabólico ocurre en vacas lecheras después del parto, debido a que los mecanismos de homeostasis del calcio no bastan para reponer el calcio plasmático destinado a la producción de calostro y leche. Los descensos más bruscos ocurren entre las 12-24 horas después del parto (Oetzel, 2015; Kimura et al, 2006). Varios factores están involucrados en la causación de la hipocalcemia subclínica y clínica, incluyendo el proceso del parto, el inicio de la lactancia, la edad, raza, nivel productivo de la vaca y el tipo de dieta ofrecida (Horst et al, 1997). Por lo general, la incidencia de hipocalcemia es mayor en vacas de segunda lactancia en adelante que en las primíparas debido a que la cantidad de leche

que estas (las multíparas) producen es mayor (Oetzel y Miller, 2012; Kurosaki et al, 2007; Oetzel, 2015; Horst et al, 1994).

Durante el periodo horro, o periodo de cese de lactancia, la necesidad fisiológica de calcio en el plasma sanguíneo es mínimo y por ende, los mecanismos de reposición del calcio permanecen inactivos. Al momento del parto, la vaca requiere aportar más de 30g Ca/dL sangre hacia el fluido extracelular, y como consecuencia de esto, casi todas las vacas presentan algún grado de hipocalcemia durante el primer día de lactancia (Horst et al, 1997). La necesidad fisiológica de obtención de calcio de manera rápida para el cumplimiento de los requerimientos de mantenimiento y producción de leche del animal activa la secreción de la Para-hormona (PTH) desde la glándula paratiroides. Esta hormona es responsable de regular las concentraciones de iones de calcio en el fluido extracelular. Su acción resulta en la resorción de calcio de las estructuras óseas, estimulando los osteoclastos para degradar los huesos y permitir la liberación de calcio hacia el torrente sanguíneo. Como resultado de la hipocalcemia, la función neuromuscular de la vaca se ve afectada, provocando una cascada de eventos negativos como la disminución en consumo de alimento y producción de leche, mientras aumenta el riesgo de enfermedades (mastitis, metritis, retención de placenta, desplazamiento del abomaso y cetosis). (Oetzel, 2015).

En los hatos lecheros, la hipocalcemia subclínica tiene un efecto negativo en la eficiencia de la empresa al promover mayor mortandad de animales y la predisposición a otras enfermedades secundarias tales como tetania y paresis, entre otras. Por consiguiente, la hipocalcemia causa pérdidas económicas significativas a la industria lechera, reduciendo la vida

productiva de la vaca por cerca de 3.5 años y provocando pérdidas estimadas de \$334 por animal. Esto incluye los costos de tratamientos y pérdidas de producción de leche (Horst et al, 1997). Desde hace varias décadas, investigadores de todo el mundo han propuesto diversos métodos para la prevención de la hipocalcemia. Se ha estudiado el uso durante el periodo preparto de dietas bajas en contenido de calcio (Van de Braaki et al, 1986) y dietas aniónicas (DeGroot et al, 2010; Wu et al, 2008; Kurosaki et al, 2007), administración masiva de 1,25-dihidroxitamina D (Hibbs et al, 1946; Littlelike y Horst, 1982), suplementos de calcio posparto (Goff y Horst, 1993; Oetzel, 2003), entre otros. Sin embargo, en Puerto Rico no se conoce detalladamente la magnitud del problema de hipocalcemia, por lo que no es posible recomendar un protocolo ideal para prevenir este mal en las vaquerías locales.

2.0 OBJETIVOS

Evaluar los efectos de suministrar calcio en forma de un gel vía oral como método de prevención de hipocalcemia y mejoramiento de la productividad de la vaca lechera durante la lactancia temprana.

3.0 REVISIÓN DE LA LITERATURA

La leche ha sido un alimento importante utilizado por las sociedades humanas como fuente de calcio por más de ocho mil años. Además de su consumo en su estado fresco como bebida, la leche se ha destinado a la fabricación de distintos productos derivados como el queso, el yogurt, la mantequilla, el mantecado y la chocolatina. La disponibilidad de calcio en la leche bovina es de 1.2g Ca/kg de leche, del cual el 40% es absorbido y utilizado por múltiples funciones esenciales del cuerpo como la coagulación de la sangre, la formación de los huesos y la reparación de los osteoblastos¹. Un consumo adecuado de calcio aumenta la densidad de minerales en los huesos durante el crecimiento de estos y previene la pérdida de hueso y fracturas en la adultez (Caroli et al, 2011).

El mantenimiento de una adecuada homeostasis de macrominerales en el cuerpo del animal es imprescindible para la producción ganadera. Los macrominerales son obtenidos a través de los alimentos consumidos y/o suplementos minerales ingeridos durante el proceso de digestión, absorbidos mayormente del intestino delgado. El factor “macro” denomina que es necesario en grandes cantidades a fin de suplir las necesidades básicas de órganos específicos en el cuerpo para llevar a cabo funciones reguladoras, estructurales y catalíticas. Estos aportan poco más del 5% del peso corporal del animal, por lo que deficiencias de macrominerales en la alimentación animal pueden generar trastornos metabólicos y reproductivos, y causar pérdidas económicas a corto y a largo plazo en la ganadería (Aasif et al, 2008).

¹ Osteoblastos se refiere a las células del hueso encargadas de sintetizar la matriz ósea.

El calcio es uno de los macrominerales requeridos en más alta cantidad en el animal. Este mineral es necesario para llevar a cabo múltiples funciones metabólicas como la excitación neuro- muscular, la coagulación de la sangre, la secreción de hormonas y funciones estructurales como parte del sistema esquelético (Wu et al, 2008; Goff, 2008 (A); Goff, 2008 (B)). Las concentraciones de calcio en el plasma sanguíneo son controladas mediante la coordinación de secreciones de varias hormonas. Por un lado, la hormona paratiroides (PTH) y 1,25-dihidroxitamina D³ (Amaral, 2014) son secretadas en respuesta a la hipocalcemia y actúan para aumentar las concentraciones de calcio en el plasma sanguíneo. También la secreción de calcitonina es importante en el proceso de homeostasis de calcio y actúa de modo contrario, siendo liberada en presencia de altas concentraciones de calcio en la sangre (DeGaris y Lean, 2009). Un descenso en las concentraciones de calcio en el plasma sanguíneo va a causar la secreción de PTH desde la glándula paratiroides (Horst et al, 1997; Van de Braaki et al, 1986). Esta secreción causa un aumento en la reabsorción de calcio renal desde el filtrado glomerular. Cuando la utilización de calcio del plasma sanguíneo se torna baja, esta volverá a su estado normal rápidamente y la secreción de PTH cesa. Si al contrario la utilización de calcio del plasma sanguíneo es alta, como ocurre durante la lactancia, la secreción continua de PTH estimula la reabsorción de calcio almacenado en los huesos (Horst et al, 1997).

Los huesos constituyen la mayor reserva de calcio (Horst et al, 1997) representando el 99% del total presente en el cuerpo (DeGaris and Lean, 2009). En su micro anatomía, los huesos están compuestos por células alineadas rodeadas de fluido rico en calcio. Cuando ocurre estimulación de PTH como consecuencia de una disminución de calcio en el plasma sanguíneo, las células alineadas del hueso transfieren el fluido del hueso al fluido extracelular. Horst y

colaboradores (1997) demostraron que la concentración de calcio en el fluido del hueso en vacas alimentadas con una dieta alta en forrajes varía entre 6 y 10g Ca/mL de fluido óseo. Además determinaron que al inducir una acidosis metabólica mediante la suplementación de aniones como cloruros y sulfatos, la concentración de calcio en el fluido óseo puede aumentar por 6 a 8g Ca/mL adicional.

La PTH también tiene la capacidad de inducir la secreción de calcitonina (una enzima renal que inhibe la liberación de PTH) al producir 1,25- dihidroxivitamina D³. Esta vitamina actúa como hormona y al unísono con la PTH para aumentar el calcio en el plasma sanguíneo estimulando la resorción² de calcio de los huesos y aumentando la reabsorción de calcio renal. La citada forma activa de vitamina D tiene una gran habilidad de estimular el transporte activo y de aumentar la absorción de calcio dietético mediante la calcitonina; una proteína específica que acarrea el calcio a través de las células epiteliales del intestino (Horst et al, 1997). Bajo condiciones normales, las vacas dependen más de la absorción de calcio de los intestinos que de los huesos para mantener una homeostasis de calcio en la sangre (DeGaris y Lean, 2009).

Durante el periodo de transición de horra a lactante, la vaca lechera experimenta mucho estrés debido al alto nivel de producción de leche que se aproxima. Esto ocurre luego del periodo horro durante el cual la glándula mamaria lleva a cabo la regeneración de tejido secretor en preparación para la lactancia subsiguiente (Sampson et al, 2006). El periodo de transición se caracteriza por cambios drásticos en el sistema endocrino como la producción y liberación súbita de ciertas hormonas (Mulligan y Doherty, 2008). El periodo de transición comprende

² Resorción ósea se refiere al proceso por el cual los osteoclastos eliminan el tejido óseo mediante la extracción de los minerales.

aproximadamente ocho semanas; cuatro antes y cuatro después del parto. Es aquí donde la vaca experimenta el nivel más alto de estrés durante su ciclo productivo y aumenta su susceptibilidad a varias enfermedades (DeGaris y Lean, 2009) las cuales se mencionarán más adelante.

Debido a que los requerimientos de calcio son menores antes del parto, los mecanismos de reposición de calcio del plasma permanecen inactivos (Horst et al, 1997). Durante el periodo del parto y lactación temprana, el calcio es secretado en grandes cantidades en los fluidos lácteos: calostro y leche, con una excreción aproximada de más de 30g Ca/mL de sangre hacia el fluido extracelular. Durante éste período, el fluido extracelular al circular y llegar a la glándula mamaria descarga parte de su calcio que luego se destina a las secreciones lácteas. Este proceso ocurre tan rápido que el calcio que estaba disponible en el fluido extracelular es repuesto mediante la absorción intestinal de calcio (Goff and Horst, 1993). Cuando la disponibilidad de calcio plasmático disminuye por debajo de los requerimientos ($<8.0\text{mg/dL}$), la vaca entra en un estado de balance de calcio negativo y entonces se activan estos mecanismos homeostáticos para reponer el mismo (Thilsing y Jorgensen, 2001).

El buen manejo de la vaca lechera debe asegurar un aumento en la absorción del calcio dietético a partir de aproximadamente tres semanas antes del parto, o proveer métodos para activar el mecanismo de movilización de calcio óseo más eficientemente. Esta práctica busca minimizar el descenso de las concentraciones de calcio en la sangre durante el periodo de transición (Goff y Horst, 1993). Sin embargo, la remoción excesiva de calcio de los huesos es perjudicial para el animal y puede causar otras enfermedades y problemas de parto (Aasig et al, 2008), acarreando una cascada de eventos negativos como la reducción del consumo de materia

seca, disminución de la producción de leche y un aumento de casos de enfermedades metabólicas. Las vacas que han experimentado hipocalcemia tienen una mayor probabilidad de padecer inflamaciones en la glándula mamaria (mastitis), hígado graso (cetosis) (Horst et al, 1997), distocia (partos dificultosos), retención de placenta, desplazamiento del abomaso y prolapsos uterinos (Horst et al, 1997). Esto ocurre debido a que el calcio disponible en el torrente sanguíneo es indispensable para el funcionamiento del músculo esquelético y la motilidad gastrointestinal (Oetzel, 2015). Por otro lado, estudios señalan que vacas próximas al parto a las cuales se les ha removido quirúrgicamente la glándula mamaria no desarrollan hipocalcemia y no sufren una inmunosupresión excesiva de la misma manera en que las vacas lactantes si lo hacen (Goff et al, 2002). Por lo tanto, esta condición está relacionada con la producción de leche al inicio de la lactancia en la vaca lechera genéticamente desarrollada para alta producción de leche.

La hipocalcemia y su manifestación clínica conocida como fiebre de leche, es una enfermedad de gran interés en la ganadería lechera al menos desde el año 1920. Como indica su nombre, a hipocalcemia está caracterizada por niveles subnormales de iones de calcio en el plasma sanguíneo (<8.0 y $<5.0\text{mg/dL}$, en casos subclínicos y clínicos, respectivamente). La baja disponibilidad de calcio afecta la productividad del animal y predispone al mismo a otras enfermedades metabólicas (Kurosaki et al, 2007; Hibbs et al, 1946). Debido al alto requerimiento de calcio durante el periodo puerperal, casi todas las vacas lecheras experimentan cierto grado de hipocalcemia en el primer día posparto, mientras los intestinos y los huesos se adaptan a la demanda de calcio requerido durante la lactación (Horst et al, 1997). Los síntomas más comunes de la hipocalcemia clínica varían desde inapetencia, irritabilidad muscular, inhibición de la

micción³ y la defecación, entumecimiento de extremidades, depresión y, en casos extremos, hasta la muerte (Horst et al, 1997; Goff, 2008). Aunque el nombre indica "fiebre", este no es uno de los síntomas típicos (Goff, 2008 (A)). Se ha estimado que hasta el 70% de las vacas clínicamente hipocalcémicas pueden morir si no reciben tratamiento terapéutico (Horst et al, 1997). No obstante, se ha estipulado que, aun en ausencia de signos clínicos visibles, la hipocalcemia se considera como negativa en términos económicos (Oetzel, 2015).

Comúnmente, se diagnostica hipocalcemia en el 50% de las vacas lecheras periparturientas (Wu et al, 2008; Oetzel, 2015). Las vacas de primera lactancia rara vez presentan éste desorden metabólico debido a que su producción de calostro y de leche es menor que la de las vacas de segunda lactancia en adelante. Las vacas primíparas no atraviesan por un estado de estrés severo y necesitan utilizar menos calcio dietético y óseo, estando sus huesos aún en crecimiento. Adicional a esto, las vacas adultas poseen menos receptores para vitamina D en el tracto gastrointestinal, en los osteoblastos y en los osteoclastos, lo que le limita movilizar el calcio en periodos cercanos al parto (Phillips, 2010). Una vaca que produce 10L de calostro puede perder 23g Ca en un solo ordeño. Esta cantidad es de 6 a 9 veces mayor que la cantidad de calcio presente en el plasma sanguíneo de una vaca lechera (Horst et al, 1997; Stokes, 1998). La incidencia de la hipocalcemia puede variar de acuerdo a la edad, raza, producción de leche, condición corporal, alimentación y largo del periodo horro (Aasig et al, 2008, Block, 1984, Horst et al, 1997). Éste desorden tiene un gran impacto sobre la salud de la vaca lechera recién parida, en la producción futura de leche y en el desempeño reproductivo (Amaral, 2014). No obstante, las vacas con el sistema inmunológico comprometido por infecciones tienen mayor probabilidad de padecer esta condición (Goff, 2008 (B)). Curtis et al. (1983) estudiaron la incidencia de ocho

³ Micción se refiere al acto de orinar.

enfermedades (mastitis por coliformes, mastitis por otros patógenos, metritis, retención de placenta, desplazamiento del abomaso, cetosis, cojeras y distocia) en 33 vacas hipocalcémicas de raza Holstein. Se verificó si existía asociación significativa de la hipocalcemia con el padecimiento de todas las enfermedades antes mencionadas. Solo el desplazamiento del abomaso mostró semejante tendencia al aumentar su incidencia en las vacas hipocalcémicas.

Las enfermedades metabólicas de la vaca lechera en producción son una manifestación de la falta de nutrientes suficientes para cumplir con todos los requerimientos de mantenimiento corporal y lactación. Los resultados son pérdidas económicas en la industria lechera (Mulligan and Doherty, 2008). El tiempo crítico de cuidado en vacas lecheras comprende los primeros días después del parto. El desempeño fisiológico y productivo que muestre la vaca durante estos primeros días suele indicar cómo se desempeñará en el resto de la lactancia (Stokes, 1998). La hipocalcemia subclínica significa para el ganadero un mayor costo que los casos clínicos debido a que afecta a un mayor porcentaje de animales en el hato lechero (Oetzel, 2015). Las causas mayores de pérdidas económicas son caracterizadas por muerte de animales y costos altos de tratamientos. También merece consideración como pérdidas económicas la probabilidad de incidencia de otros desórdenes metabólicos en vacas lecheras próximas al parto y la disminución en la producción de leche (Oetzel, 2003). Guard et al. (1996) realizaron un estudio de simulacro de un hato lechero compuesto por 2,000 vacas con una incidencia de hipocalcemia clínica de un 2% al año, en el cual cada caso significa un costo de \$300, para un total de \$12,000 por año. Sin embargo, si el mismo hato lechero tiene un 30% de incidencia de hipocalcemia subclínica al año en vacas de segunda lactancia en adelante, y cada caso significa un costo de \$125 (estimando costos de pérdida en producción de leche y enfermedades secundarias), el total de pérdidas por

casos de hipocalcemia subclínica suman a \$48,750 por año. Esto es cuatro veces más alto que los costos de los casos clínicos (Oetzel, 2015).

La hipocalcemia bovina fue reportada en la literatura científica por primera vez en el año 1793 bajo la autoría de Eberhardt. Para el año 1806, Price recomendó la utilización de compresas calientes y el arropar el animal para provocar la sudoración profusa como método para tratar esta condición. Clater (1814) sugirió provocar la pérdida de sangre masiva del animal (entre 4 a 5L/día) por un término de ocho a diez días. Investigadores favorecieron las prácticas de aplicar agua fría sobre la cabeza del animal y frotar pimienta de cayena y alcohol en las patas.

Según citado por Hibbs et al. (1946), en el 1897 Schmidt pensó que esta condición era causada por una infección mamaria. Para curar esta supuesta infección, sugirió inyectar en la ubre yoduro de potasio, resultando en una reducción de hasta un 70% en la mortalidad de los animales afectados. Hibbs et al. (1946) a su vez citó que en el 1925 Little y Wright se percataron de que las concentraciones de calcio del plasma sanguíneo disminuían drásticamente en las vacas que padecían fiebre de leche. Así se comenzó a utilizar el calcio intravenoso como método de tratamiento para esta enfermedad. No obstante, las concentraciones excesivamente altas de calcio en la sangre podían causar arresto cardíaco en el animal tratado.

La prevención de éste desorden metabólico ha sido un tema de investigación intensiva durante los últimos cincuenta años (Thilsing y Jorgensen, 2001). Evitar la hipocalcemia podría significar un aumento de 227- 458 kilogramos de leche en la lactancia sub- siguiente (Oetzel, 2015; Stokes, 1998). Se han investigado diferentes métodos para la prevención de la

hipocalcemia, entre estos: la administración súbita de vitamina D o sus metabolitos en tiempos específicos antes del parto, proveer una dieta acida (dieta aniónica) y manipular las proporciones de calcio, fósforo y potasio en la dieta preparto del animal (Block, 1984).

Hace muchos años se reconoció que la vitamina D tiene una función en el metabolismo del calcio. Por sus propiedades calcémicas y su costo relativamente barato, se propuso el uso de la vitamina D en dosis masiva antes del parto para promover la absorción de calcio dietético y así prevenir la hipocalcemia. No obstante, se desconocía el mecanismo específico de esta función específica. La experimentación con vacas lecheras demostró que grandes cantidades de vitamina D antes del parto aumentaba significativamente las concentraciones de calcio en la sangre (Hibbs et al, 1946). También se demostró que la vitamina D era importante para la absorción de calcio en los intestinos (Horst et al, 1997).

Hibbs et al (1946) experimentaron con vacas lecheras de cuatro razas: *Holstein*, *Jersey*, *Ayrshire* y *Guernsey*, incluyendo vacas primíparas y multíparas de tres de las cuatro razas, pero solo vacas Jersey multíparas. Formaron dos grupos iguales de animales referentes a la raza, edad, fecha estimada de parto e historial de padecer fiebre de leche. Hubo un grupo suplementado con vitamina D y un grupo testigo sin suplementación. La suplementación con vitamina D ocurrió cuatro semanas antes de la fecha esperada del parto y luego semanalmente después del parto, durante cinco semanas. Se encontró que la suplementación con vitamina D no previno la fiebre de leche en vacas sin historial previo de la misma. Sin embargo, la vitamina D redujo la incidencia de fiebre de leche en vacas que ya habían presentado la enfermedad. Las vacas de raza *Jersey* presentaron mayor incidencia de fiebre de leche en comparación con las otras razas. Horst

et al. (1994) aportaron una explicación de esto al observar que las vacas de raza *Jersey* tienen pocos receptores intestinales de vitamina D.

En las regiones templadas, la necesidad de suplementación con vitamina D para la hipocalcemia varía con la estación del año, debido a que tradicionalmente había mayor incidencia de casos a fines de invierno y principios de primavera cuando la irradiación había sido débil por varios meses con agotamiento de las reservas corporales de la vitamina. En Puerto Rico la intensidad de la irradiación solar no varía grandemente durante todo el año, lo que minimiza la influencia de la estación. Además, al estar disponible la vitamina D sintética para uso en la alimentación, ya no se depende tanto de la irradiación ultra violeta natural para abastecer al animal con vitamina D. La dosificación con vitamina D como método de prevención de la hipocalcemia es efectiva siempre y cuando se sincronice con la fecha del parto. Más de una dosis de vitamina D puede ser requerida si no se acierta la fecha del parto. Sin embargo, repetidos tratamientos pueden resultar en casos de animales intoxicados por exceso Vitamina D (Block, 1984).

Littlelike et al. (1982) demostraron que, a pesar de que las vacas de su estudio fueron tratadas con vitamina D, estas presentaron hipocalcemia con signos clínicos. Esto fue explicado debido a la utilización de compuestos derivados de la vitamina D los cuales inhiben la producción de la vitamina D endógena y así inhabilitan la recuperación de los episodios de hipocalcemia (Horst et al, 1997).

Desde la década de los 1980, el interés investigativo ha cambiado hacia la regulación del balance iónico de la dieta como método de prevención de la hipocalcemia (Horst et al, 1997). Se ha mostrado que proveer una dieta ácida, es decir en las que predominen los aniones sobre los cationes, representa un buen método de prevención de hipocalcemia y sostenimiento de la producción de leche (DeGroot et al, 2010). Oetzel (2004) encontró que el uso de dieta aniónica (dieta ácida) reduce la incidencia de hipocalcemia en vacas lecheras en un 15% a 25%.

Kurosaki et al. (2007) utilizaron treinta vacas lecheras multíparas y diez primíparas de raza *Holstein* para comparar el efecto de suplementar dietas aniónicas, dietas catiónicas y dietas sin alteraciones (testigo), sobre la incidencia de hipocalcemia. La dieta aniónica consistió en adiciones de carbonato de calcio, bifosfato de calcio, sulfato de magnesio hepta- hidratado y cloruro de calcio di-hidratado. La dieta de balance catiónico incluyó adiciones de calcio y magnesio, pero no tenía sulfato ni cloruro. Se encontró que en los animales suplementados con dietas aniónicas, los casos de hipocalcemia se redujeron en casi un 50% en comparación a los animales que tenían asignadas las dietas catiónicas y la dieta control, y las concentraciones de calcio en el suero sanguíneo eran más altas que vacas alimentadas con dieta catiónica y control. Además se encontró que el pH urinario en las vacas con dieta aniónica se mantuvo en un promedio ácido (<7.0), mientras que las vacas de dieta catiónica, vacas del grupo control y las primíparas pasaban del promedio de pH urinario, siendo este más alcalino (>7.0). Un pH urinario bajo es indicativo de un buen balance de aniones en la dieta animal. Por lo tanto, este estudio demostró que la utilización de dieta aniónica es un método efectivo para la prevención de hipocalcemia en vacas lecheras.

Otro estudio similar fue el de Block (1984) que utilizó treinta vacas lecheras para comprobar los efectos de una dieta aniónica relativo a una dieta catiónica sobre la incidencia de la hipocalcemia. Las vacas que consumieron dieta aniónica no presentaron fiebre de leche. Sin embargo, las vacas que consumieron dieta catiónica tuvieron un 47.4% de incidencia de hipocalcemia. Los resultados de las muestras de sangre mostraron que las vacas que consumieron dieta aniónica mantuvieron la disponibilidad de calcio y fósforo en el momento del parto. Sin embargo, aquellas que consumieron dieta catiónica no tenían disponible calcio y fósforo en el parto. Además, aquellas vacas suplementadas con dietas catiónicas tuvieron una disminución en la producción de leche de un 6.8% (Block, 1984).

Otros estudios han demostrado resultados similares en los que dietas aniónicas aumentaban la concentración de calcio en el suero sanguíneo, y a su vez, disminuían el pH en la orina (Wu et al, 2008; Aasif et al, 2008; Thilsing y Jorgensen, 2001; Moore et al, 2000). No obstante, DeGroot et al. (2010), en un estudio con vacas lecheras periparturientas, encontraron que en las vacas que recibieron dietas aniónicas, los niveles de calcio en la sangre disminuían a lo largo de la lactancia, mientras que la producción de leche y el consumo de materia seca post-parto aumentaron, favoreciendo la salud y productividad del animal.

Charbonneau et al. (2006) condujeron un meta- análisis de estudios recientemente publicados y determinaron que proveer una dosis típica de aniones antes del parto puede reducir cinco veces el riesgo de contraer fiebre de leche. Sin embargo, bajo condiciones practicas resulta muy difícil preparar raciones dietéticas aniónicas (<20g de calcio/vaca/día) (Sorensen et al, 2002). DeGaris y Lean (2009) indicaron que, aunque es apropiado darle un enfoque al manejo

nutricional del hato lechero como método de prevención de la hipocalcemia, no todos los casos de hipocalcemia son el resultado de la formulación de raciones. Por otro lado, aunque la suplementación de dietas aniónicas en vacas lecheras ha resultado efectiva como método de prevención de la hipocalcemia, aún en aquellos hatos lecheros donde se practican programas exitosos de dietas aniónicas y en los cuales la incidencia de fiebre de leche es mínima, es necesario utilizar suplementos de calcio vía oral (Oetzel y Miller, 2012).

La suplementación de calcio en distintas formas ofrece otra alternativa para prevenir la fiebre de leche. Goff y Horst (1993) realizaron un estudio con vacas lecheras no preñadas y que no estaban lactando. Su propósito era observar los efectos de la suplementación de distintos productos de calcio intravenoso sobre las concentraciones de calcio en el plasma sanguíneo. Entre las distintas fuentes de calcio que Goff utilizó se encontraban: carbonato de calcio, propionato de calcio y cloruro de calcio. Goff concluyó que la mejor fuente de calcio como suplemento dietético para prevenir la hipocalcemia es el cloruro de calcio con una dosis de 50 gramos de calcio en 250 mililitros de agua. Sin embargo, si el calcio se diluye demasiado, el efecto es mínimo. No obstante, aunque el propionato de calcio no fue efectivo en cuanto a aumentar significativamente las concentraciones de calcio en el plasma sanguíneo, el aumento era persistente. El suministro intravenoso de calcio fue efectivo como método de prevención de la hipocalcemia (Goff y Horst, 1993), pero un exceso de este puede ser tóxico para el animal (Horst et al, 1997).

Otro logro beneficioso para la industria lechera para prevenir la hipocalcemia ha sido el desarrollo de suplementos orales de calcio debido a la alta disponibilidad de calcio provisto. La

disponibilidad comercial de suplementos orales de calcio como método preventivo de la fiebre de leche ha re-creado interés en la utilización del mismo para prevenir este desorden metabólico (Goff y Horst, 1993). Los estudios han confirmado que estos suplementos de calcio oral ejercen efectos positivos y consistentes preventivos de hipocalcemia, superiores a otros recursos, debido a que el mismo es absorbido mediante difusión pasiva (Thilsing- Hansen et al, 2002). Beede et al. (1992) realizaron un estudio con 510 vacas próximas al parto para evaluar la eficacia de la suplementación con bolos de calcio, dejando 255 vacas sin suplementar y las otras 255 con suplementación con bolos de calcio. El 50% de las vacas sin tratar presentaron hipocalcemia después del parto. Sin embargo solo el 19% de las vacas del grupo suplementado presentaron la enfermedad.

Oetzel et al. (2012) estudiaron la utilidad de suplementación con bolos de calcio después del parto para prevenir la hipocalcemia e incentivar la producción de leche. En dos grupos de vacas probaron aleatoriamente dos tratamientos, con y sin el suministro de dos bolos de calcio después del parto. Las vacas suplementadas con bolos de calcio después del parto presentaron mejor desempeño de producción de leche, con un aumento aproximado de 2.9kg de leche. Adicionalmente, la hipocalcemia clínica se presentó solamente en un 0.6% de las vacas, y la hipocalcemia subclínica se presentó solo en el 14.2% de los animales suplementados con bolos de calcio entre las 8 y las 42 horas después del parto en comparación al grupo control, por lo que si fue efectivo el suplemento dietético de calcio después del parto.

Oetzel (2003) realizó un estudio para evaluar el efecto de suplementar con gel de calcio oral sobre la incidencia de la hipocalcemia en vacas periparturientas. Se utilizaron 204 vacas, las

cuales se separaron considerando el número de parto, la fecha de parto e incidencia previa de fiebre de leche. Se les asignó tratamiento de calcio oral a una vaca, y a la otra no, de manera aleatorizada. El calcio fue administrado cuatro veces: 12 horas antes del parto, inmediatamente después del parto, y 12 y 24 horas después del parto. Solo el 8% de los animales tratados presentaron hipocalcemia. La suplementación oral de calcio aumentó significativamente las concentraciones de calcio en el plasma sanguíneo, y a su vez disminuyó la incidencia de hipocalcemia, desplazamiento del abomaso y paresis en comparación al grupo control.

Dhiman y Sasidharan (1999) también estudiaron el efecto de la suplementación de gel de cloruro de calcio en las concentraciones de calcio en la sangre de vacas lecheras de raza Holstein. Los animales se suplementaron 2 y 12 horas después del parto. Se encontró que las concentraciones de calcio en las vacas aumentaron después del tratamiento y previno la hipocalcemia.

La utilización de geles de calcio que aportan un total de 54 gramos del elemento de calcio antes del parto, ha sido un método efectivo para prevenir la hipocalcemia mediante un aumento rápido en las concentraciones de calcio en el plasma (Oetzel, 2003).

En climas tropicales no se tiene conocimiento de ningún estudio realizado para evaluar medidas de prevención de hipocalcemia en vacas lecheras. En el ambiente tropical de Puerto Rico, hay diversos factores que afectan la producción de leche y la salud animal que podrían ser aliviados tal vez por la suplementación eficaz de vacas periparturientas con calcio.

4.0 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Animales

Este experimento se llevó a cabo en la vaquería de la Estación Experimental de Lajas de la Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez. Se utilizaron 60 vacas lecheras preñadas de la raza Holstein, 19 primíparas y 41 multíparas. El experimento se realizó a lo largo de la época de parto durante los meses de septiembre 2014 a febrero 2015. Las vacas se dividieron en dos grupos aleatoriamente, alternando los tratamientos asignados de acuerdo a la fecha del parto. El mismo procedimiento se realizó por separado con las vacas primíparas y multíparas de manera de balancear los dos grupos según este criterio lo mejor posible.

4.2 Suplemento de calcio

Las vacas lecheras del grupo experimental (CA) recibieron un suplemento de calcio vía oral que constó de una dosis de 300mL de una gel mineral comercial (CMPK, AgriLabs, Missouri, US.), suministrada de 6 a 12 horas después del parto, según recomendado por la etiqueta del producto. El gel tiene como ingrediente activo entre 54 a 60 gramos de calcio en 300mL de gel. Además de calcio, contiene magnesio, fósforo y potasio. La composición química de la gel comercial provista por la compañía se presenta en la Tabla 1. Las vacas del grupo testigo (CO) no recibieron ningún tratamiento.

Tabla 1: Composición química garantizada y lista de ingredientes de la gel de calcio comercial suministrada a vacas del grupo experimental (CA).

Gel CMPK		
Nutrientes:	Cantidad (g):	Porcentaje (%):
Calcio (Ca) min.	54	13.5
Calcio (Ca) máx.	60	15.0
Fósforo (P) min.	10	2.5
Magnesio (Mg) min.	2.9	0.725
Potasio (K) min.	1.0	0.25
Ingredientes:		
Cloruro de calcio	-	-
Base de gel	-	-
Fosfato de calcio	-	-
Cloruro de magnesio	-	-
Cloruro de potasio	-	-
Contenido neto:	300mL	100

4.3 Dieta

Se alimentaron los animales con un alimento concentrado de lactancia con un 14% de proteína cruda (PC), y otro para vacas horras en periodo de transición con un 14% de proteína cruda (PC). Este último se utilizó a partir de tres semanas antes de la fecha estimada de parto, para un total de 15 libras de alimento por vaca por día. En las Tablas 2 y 3 se muestran los análisis de densidad nutricional e ingredientes de ambos concentrados utilizadas. Ambos concentrados presentado contienen sales aniónicas (CaSO₄ y MgO). Además se les proveyó alimento forrajero de gramínea fresca tipo “green chop”, mayormente *Panicum maximum* (Guinea) y *Dichanthium annulatum* (Pajón) una vez al día a modo de libre disponibilidad.

Tabla 2: Densidad garantizada de nutrientes e ingredientes incluidos en alimento concentrado para vacas horras.

Nutrientes	Cantidad
Proteína Cruda (min)	14.0%
Grasa Cruda (min)	3.0%
Fibra Cruda (máx.)	12.0%
Fibra Acido Detergente (máx.)	14.0%
Calcio	0.7- 1.3%
Fosforo (min)	0.5%
Selenio (min)	0.20ppm
Vitamina A (min)	5000 iu/lb
Ingredientes	
Melaza de caña de azúcar	-
Piedra caliza molida	-
Acetato de Vitamina A	-
Suplemento de Vitamina D3	-
Suplemento de Vitamina E	-
Oxido de manganeso	-
Sulfato de zinc	-
Oxido de zinc	-
Sulfato ferroso	-
Sulfato de cobre	-
Yodato de Calcio	-
Selenito de sodio	-
Carbonato de cobalto	-
Sulfato de calcio	-
Oxido de magnesio	-
Cloruro de sodio	-
Etoxiquina (preservativo)	-

Tabla 3: Densidad garantizada de nutrientes e ingredientes incluidos en alimento concentrado para vacas próximas al parto.

Nutrientes	Cantidad
Proteína Cruda (min)	14.0%
Grasa Cruda (min)	3.0%
Fibra Cruda (máx.)	8.0%
Fibra Acido Detergente (máx.)	14.0%
Calcio	0.8- 1.5%
Fosforo (min)	0.5%
Selenio (min)	0.20ppm
Vitamina A (min)	5000 iu/lb
Ingredientes	
Biochlor	-
Energy booster	-
Piedra caliza molida	-
Acetato de Vitamina A	-
Suplemento de Vitamina D3	-
Suplemento de Vitamina E	-
Oxido de manganeso	-
Sulfato de zinc	-
Oxido de zinc	-
Sulfato de ferroso	-
Sulfato de cobre	-
Yodato de Calcio	-
Selenito de sodio	-
Carbonato de cobalto	-
Sulfato de calcio	-
Oxido de magnesio	-
Cloruro de sodio	-
Etoxiquina (preservativo)	-

4.4 Toma de las muestras de sangre y su manejo

A cada vaca se le tomó una muestra de sangre de la arteria coccígea tres veces: antes del parto (2 días antes de la fecha estimada), inmediatamente después del parto y cinco días después del parto, utilizando una aguja larga calibre 16 y 10 centímetros de longitud y un tubo colector de sangre estéril. Se identificaron las muestras de sangre y se centrifugaron por 10 minutos a una

velocidad de 1,500 rpm para separar el plasma sanguíneo. Utilizando una jeringuilla, se extrajo de cada tubo colector el plasma sanguíneo y se colocó en un tubo de almacenamiento. Nuevamente se identificaron las muestras y transportaron en nevera con hielo tapada al laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez. Se re envasó el plasma sanguíneo en tubos de almacenamiento de 1.5mL utilizando una pipeta calibrada de 0.5- 2 μ L, se colocaron todas las muestras en un plato de tubos de 1.5 mL y se congelaron a temperatura de -28°C.

4.5 Preparación de la curva estándar

Para la preparación de la curva estándar se utilizó el "kit" de detección de calcio (Colorimetric/Abcam/ab102505) el cual detecta el calcio libre en la sangre. Se utilizaron platos de 96 celdas y se preparó una curva estándar para cada plato de 96 celdas muestreado. La preparación de la curva estándar se hizo de la siguiente manera: utilizando pipetas calibradas de 2.0- 20.0 μ L y 20.0- 200.00 μ L se diluyó 10 μ L del "calcium standard" en 990 μ L de agua destilada. Se mezcló bien y se añadió 0, 2, 4, 6, 8 y 10 μ L del estándar preparado en diferentes celdas, respectivamente. Finalmente se completó el volumen de cada celda a 50 μ L utilizando agua destilada, quedando así concentraciones de calcio de 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 y 2.0 μ g/celda, respectivamente.

4.6 Preparación de las muestras

Las muestras se sacaron del congelador y se dejaron reposar a temperatura ambiente por aproximadamente una hora y media, hasta descongelarse. Para proceder con el análisis de las muestras, se utilizó dos celdas, es decir, cada muestra de suero se leyó en duplicado, para un total de 120 lecturas. Utilizando pipetas calibradas de 2.0- 20.0 μL y 20.0- 200.00 μL , se mezcló en cada celda (10 μL del plasma, 40 μL de agua destilada a temperatura ambiente, 90 μL del "chromogenic reagent" y 60 μL del "calcium assay buffer". Se dejó incubar la muestra durante 5-10 minutos a temperatura ambiente, protegida de la luz.

4.7 Análisis del plasma sanguíneo para determinar concentración de calcio

Las concentraciones de calcio se midieron inicialmente en valores de absorbancia utilizando un espectrofotómetro de luz (SpectroMax 5.0) a un largo de onda de 575nm. Se realizó una lectura de cada celda del plato por 30 minutos debido a que el cromóforo es bien inestable y puede tardar dicho largo de tiempo en dar lectura de absorbancia mas precisa. Luego, las lecturas de absorbancia se convirtieron a concentraciones de calcio utilizando valores provenientes de la curva estándar preparada con estándares conocidos, y utilizando la ecuación lineal generada.

5.0 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos recolectados se sometieron a los procedimientos GLM y CHI SQUARE utilizando el programa estadístico SAS (edición universitaria). El procedimiento GLM incluyó como variables independientes los efectos de la edad de la vaca (primípara o multípara) y del tratamiento (suplemento de calcio o testigo). Las variables dependientes fueron las concentraciones de calcio en la sangre en las tres etapas (al menos 1 día antes, inmediatamente después y 5 días después del parto) y la producción de leche en intervalos de 10 días durante los primeros 100 días de la lactancia. El procedimiento CHI SQUARE se utilizó para evaluar las variables de problemas posparto, mastitis, metritis y retención de placenta. Se consideraron como significativas las diferencias con $P \leq 0.05$.

6.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 4, y las Figura 1 y 2 se presentan las concentraciones de calcio determinadas en los tres muestreos según la edad de la vaca (P o M) y tratamiento (CA o CO). Se encontró diferencia significativa ($P= 0.03$) entre vacas P y M en las concentraciones de calcio en la sangre en el muestreo de cinco días después del parto, a favor de las vacas primíparas sobre las multíparas (13.54 vs 11.74mg/dL). Este hallazgo concuerda con los resultados de Reinhardt et al. (2011), y por Kimura et al. (2006), que encontraron que los grandes descensos de calcio sanguíneo cercanos al parto ocurren mayormente en vacas de segunda lactancia en adelante. Curtis et al. (1984) estudiaron los factores que predisponen a la hipocalcemia en las vacas y concluyeron que las primíparas rara vez presentan esta enfermedad metabólica, pero a medida que aumenta el número de lactancias, la producción de leche aumenta y, también la incidencia de hipocalcemia. La razón más probable para explicar este fenómeno es la menor producción de calostro y leche por las vacas primíparas y por ende la menor demanda por calcio y la necesidad de movilizar el calcio de los huesos.

Por otro lado, no se observó un aumento significativo ($P\leq 0.05$) en las concentraciones de calcio en la sangre a los cinco días posparto como respuesta del tratamiento, pero a dicho muestreo sí hubo una tendencia ($P= 0.10$) a que las vacas suplementadas con gel de calcio respondieron al tratamiento de manera positiva, en donde las concentraciones de calcio en la sangre aumentaron en comparación a las de las vacas no suplementadas. Cabe recalcar que todas las vacas (primíparas y multíparas) fueron alimentadas con alimento concentrado de contenido aniónico antes del parto lo que debió aportar a que la incidencia de hipocalcemia fuese baja de

manera general. Los casos de hipocalcemia se presentaron con mayor frecuencia en las vacas no suplementadas que en las suplementadas, con valores de 33 y 23% de incidencia, respectivamente. Oetzel (2015) confirmó que la suplementación de calcio oral ha resultado ser

Tabla 4: Comparación entre las medias (LSM) de las concentraciones de calcio ionizado en el plasma sanguíneo en los tres muestreos según la edad de la vaca (P o M) y tratamiento (CA o CO).

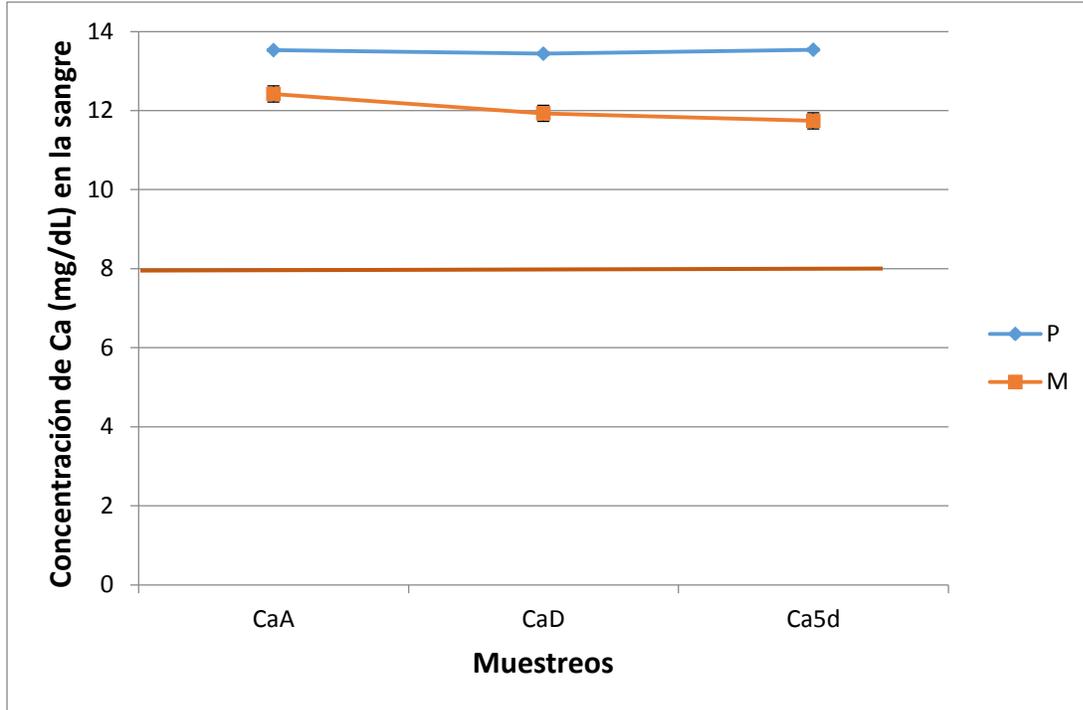
Edad	[Ca+2]		
	Antes	Parto	5 días después
P	13.54 A	13.44 A	13.54 A
M	12.42 A	11.93 A	11.74 B
Tratamiento			
CA	13.21 A	11.26 B	13.33 A
CO	12.74 A	14.11 A	11.96 A

P (primípara); M (multípara); CA (grupo suplementado con calcio); CO (grupo testigo); Ca+2 (ión de calcio)

Los valores de concentraciones de calcio con letras iguales no obtuvieron diferencias significativas ($P > 0.05$).

un método eficaz para la prevención de hipocalcemia subclínica debido a su rápida absorción intestinal y circulación al torrente sanguíneo en un intervalo de treinta minutos después de la suplementación. Sin embargo, sus efectos se mantienen elevados por solo 6 horas después de la suplementación (Goff y Horst, 1993). Kimura et al. (2006) demostraron que las células inmunológicas de las vacas hipocalcémicas disminuían el calcio intracelular, y que cerca del cuarto día después del parto las concentraciones de calcio en la sangre volvían a sus niveles normales. Por ende, sería difícil detectar cualquier efecto de tratamiento después del quinto día.

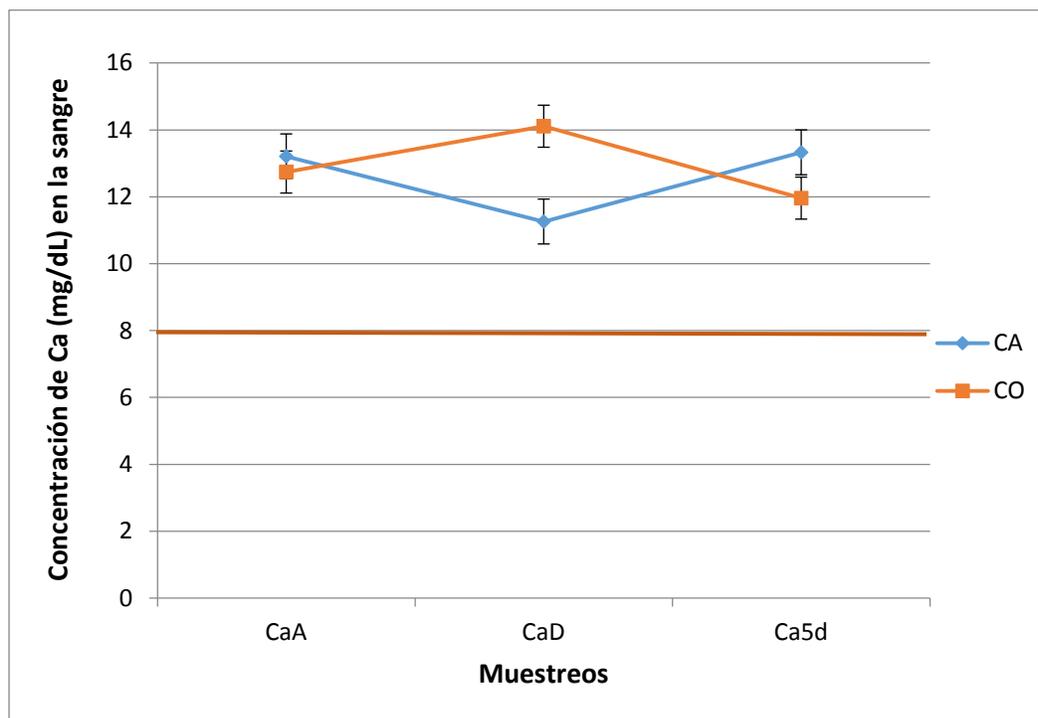
Figura 1: Cambio en las concentraciones de calcio en el plasma con relación a la edad de la vaca (P o M) a lo largo de tres muestreos.



P (primípara); M (múltipara); CaA (concentraciones de calcio antes del parto); CaD (concentraciones de calcio después del parto); Ca5d (concentraciones de calcio cinco días después del parto)

Oetzel (1996) determinó que proveer una sola dosis de suplemento de calcio oral para prevenir la hipocalcemia en el período cercano al parto no es suficiente pues su efecto no dura el tiempo necesario para contrarrestar los descensos súbitos de calcio en la sangre a lo largo de todo el periodo peripuerperal. Se cita como practica ideal proveer cuatro dosis de suplemento de calcio según el siguiente protocolo: 12 horas antes del parto, al momento del parto, 12 horas y 24 horas después del parto. Así se logró un aumento significativo en las concentraciones de calcio en la sangre a los días 1 y 2 después del parto (Oetzel, 1996). En el presente estudio, se les proveyó a nuestros animales una dosis de 54g de gel de calcio luego del parto sin obtener diferencias significativas entre las concentraciones de calcio sanguíneo comparado con el grupo

Figura 2: Cambio en las concentraciones de calcio en el plasma con relación al tratamiento (CA o CO) a lo largo de los tres muestreos.



CA (suplementado con calcio); CO (testigo); CaA (concentraciones de calcio antes del parto); CaD (concentraciones de calcio después del parto); Ca5d (concentraciones de calcio cinco días después del parto)

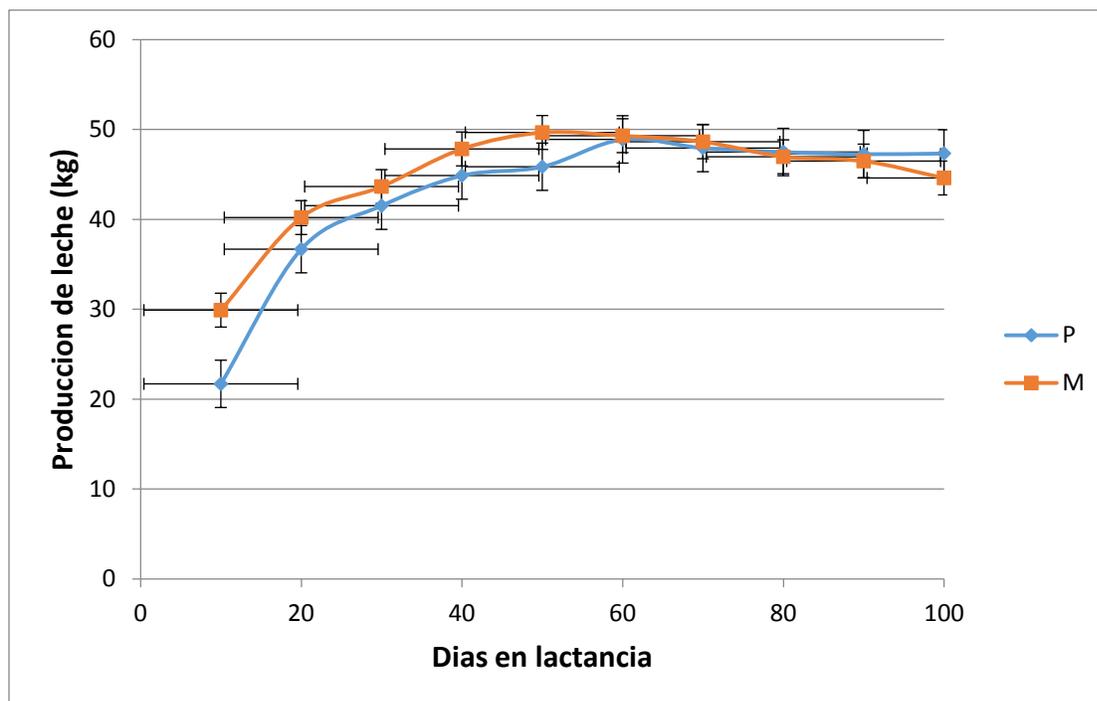
testigo. Según Oetzel (2015), el momento del parto no es el más propicio para proveer un suplemento de calcio, si no que mejores efectos pueden obtenerse suplementando al día siguiente del parto.

En el presente estudio se detectó una tendencia a que las vacas primíparas no disminuyeron tanto sus niveles de calcio sanguíneo al momento del parto contrario a las vacas múltiparas. Sin embargo, inmediatamente después del parto las vacas del grupo testigo mostraron concentraciones de calcio en la sangre mayores que las vacas del grupo experimental, cuyas concentraciones de calcio se redujeron (Figura 2). No hay explicación evidente de estos resultados inesperados que no sean las variaciones azarosas; en todo caso no tiene que ver con la

suplementación de calcio puesto que esta se proveyó después del muestreo de sangre. Sin embargo, al quinto día posparto las vacas suplementadas tuvieron concentraciones de calcio mayores en comparación a las vacas testigos. Durante los primeros días posparto la tendencia en las vacas suplementadas fue ascendente, mientras que en las no suplementadas fue descendente (Figura 2).

Durante el primer intervalo de 10 días (L10) las vacas multíparas produjeron cerca de 3.7 kilogramos diarios de leche más que las vacas primíparas (13.6 vs 9.9; $P=0.01$). La producción de leche continuó favoreciendo a las vacas multíparas sobre las primíparas, pero no significativamente hasta el sexto intervalo (L60). Luego hubo un efecto mínimo en la edad de la vaca hasta el noveno intervalo (L90) y en el último intervalo la ventaja no significativa fue de las vacas primíparas (Figura 3). Se observaron diferencias significativas ($P=0.05$) en la producción de leche promedio a favor del tratamiento de calcio sobre el grupo testigo (45.31 vs 39.86) en el tercer intervalo (L30), mientras que en el quinto intervalo (L50) dicho contraste constituyó una tendencia (49.30 vs 46.22; $P=0.07$) (Figura 4). Stokes (1998) planteó que al disminuir la incidencia de hipocalcemia es posible obtener entre 500-1,000 libras (227- 455 kilogramos) más de leche en la lactancia subsiguiente. Por lo tanto, es posible que las suplementadas con gel de calcio muestren semejante beneficio a largo plazo en su próxima lactancia. DeGroot et al. (2010) encontraron que vacas suplementadas con dietas aniónicas aumentan su producción diaria de leche por cerca de 14 libras (6.4 kilogramos). Atribuyeron este resultado al aumento en el consumo de materia seca y no a la disminuida ingestión de cationes per se.

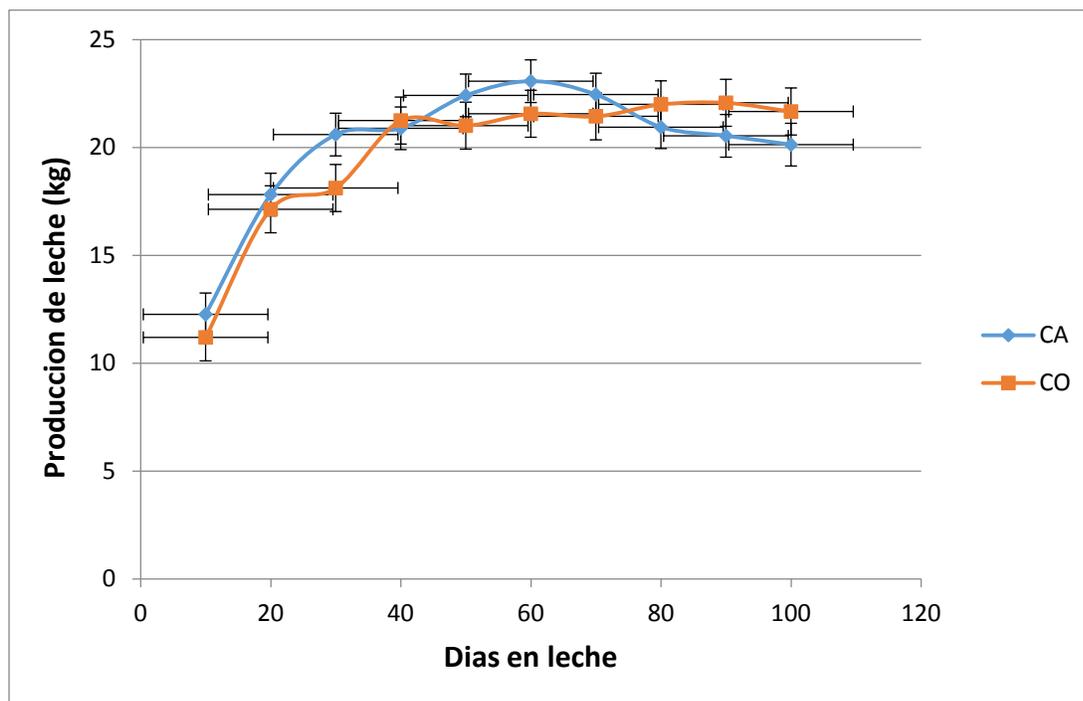
Figura 3: Producción de leche durante la lactancia temprana según la edad de la vaca (P o M).



P (primípara); M (multípara)

La producción total media durante los primeros 100 días de lactancia no fue diferente entre la edad de la vaca (P o M) ni entre el tratamiento (CA o CO). Ostergaard y Larsen (2000) observaron que descensos en las concentraciones de calcio en la sangre cercanas al momento del parto no son un riesgo para la producción de leche. Jawor et al. (2012) observaron que las vacas de tercera lactancia cuyas concentraciones de calcio sanguíneo estuvieron por debajo del promedio tuvieron la capacidad de mantener una buena producción de leche, a pesar de ello, y a su vez, las vacas hipocalcémicas, sin considerar el número de lactancias, mantuvieron una producción de leche normal durante la lactancia temprana. La relación entre la hipocalcemia y la producción de leche aun no ha sido definida. Algunos estudios indican que la producción de leche en las vacas con hipocalcemia puede ser hasta mayor, en promedio, en comparación con la producción en vacas saludables. Según Jawor et al. (2012), el problema está en que los

Figura 4: Producción de leche durante la lactancia temprana según el tratamiento (CA o CO).



CA (suplementado con calcio); CO (testigo)

últimos estudios están tomando en consideración la producción de leche en los inicios de la lactancia (Jawor et al, 2012) en vez de incluir en la evaluación otros segmentos de la lactancia en progreso y las lactancias subsiguientes. Esto podría tener aplicabilidad a los resultados del presente estudio.

El intervalo desde el parto hasta el día pico de producción no fue diferente entre la edad de la vaca (P o M), pero sí hubo diferencias significativas ($P= 0.05$) en el tratamiento (CA o CO) siendo el intervalo más corto por 13 días en las vacas suplementadas con calcio relativo a las testigo (44 vs 57 días). Esto es contrario a lo que afirma Phillips (2010) de una tendencia a que las vacas con concentraciones bajas de calcio en la sangre alcanzan el pico de producción de

Tabla 5: Comparación entre las medias (LSM) de los días de pico de producción de leche, producción de leche al día pico y producción de leche promedio a los 100 días con relación a la edad de la vaca (P o M) y tratamiento (CA o CO).

Edad	Día pico	Prod pico (kg)	Prod L100 (kg)
P	46 A	32 A	20 A
M	55 A	31 A	20 A
Tratamiento			
CA	44 A	31 A	20 A
CO	57 B	31 A	20 A

Los valores de concentraciones de calcio con letras iguales no obtuvieron diferencias significativas ($P>0.05$).
 Los valores de concentraciones de calcio con letras diferentes obtuvieron diferencias significativas ($P<0.05$).

leche antes de lo esperado debido a la alta demanda de calcio para lactación y la dificultad que tienen las vacas en esta condición para cumplirla. No hay razón evidente para explicar el presente resultado, sin embargo el nivel de producción diaria al pico no difirió entre tratamientos (CA o CO). La edad de la vaca tampoco afectó este resultado (Tabla 5). La producción promedio de los primeros 100 días de lactancia no fue diferente entre tratamientos ni edad.

Se evaluó la incidencia de problemas de parto (Tabla 6) y la incidencia de enfermedades como retención de placenta (Tabla 7), mastitis (Tabla 8) y metritis (Tabla 9) en relación a la edad de la vaca (P o M) y al tratamiento (CA o CO) en los primeros 50 días después del parto. Las vacas multiparas fueron las mayoritariamente afectadas por retención de placenta y también tuvieron problemas al parto. Según Goff (1999) la causa de retención de placenta después del parto de la vaca es debido a que la condición de hipocalcemia aumenta la secreción de cortisol, provocando estrés continuo. Existe más evidencia experimental que apoya esta hipótesis (Houe

et al, 2000). El efecto de la hipocalcemia puede ser explicado por la necesidad fisiológica del calcio en el animal para facilitar las contracciones musculares del útero durante el proceso de expulsión del feto y, posteriormente, la placenta. DeGaris y Lean (2009) mencionaron que frecuentemente las lesiones músculo- esqueléticas son causadas, en la mayoría de los casos, por la hipocalcemia. Goff (2008 (B)) reafirma su planteamiento que todos los efectos negativos luego de un descenso en las concentraciones de calcio después del parto son causados debido a que el calcio en la sangre es esencial para la función muscular y nerviosa, en especial en el soporte del músculo esquelético y la motilidad gastrointestinal. En el presente estudio se encontró que la mayor parte de los casos en los que se presentaron problemas de parto fue en las vacas no suplementadas con calcio (control). Según varios autores, los problemas de parto están relacionados con una asistencia no- apropiada en el parto y periodos de estrés cercanos al momento del parto (Mulligan y Doherty, 2008; Mee y Teagasc, 2008).

Tabla 6: Incidencia de problemas de parto según la edad de la vaca (P o M) y tratamiento (CA o CO)

	Problemas de Parto	
	SI	NO
Tratadas (CA)		
P	0	11
M	2	17
Total	2	28
No- tratadas (CO)		
P	1	7
M	2	20
Total	3	27

CA (suplementada con calcio); CO (testigo); P (primípara); M (multípara)

Tabla 7: Incidencia de retención de placenta según la edad de la vaca (P o M) y tratamiento (CA o CO).

Retención de Placenta		
Tratadas (CA)	SI	NO
P	0	11
M	2	17
Total	2	28
No- tratadas (CO)	SI	NO
P	0	8
M	1	21
Total	1	29

CA (suplementado con calcio); CO (testigo); P (primípara); M (multípara)

El estrés del parto está asociado con un aumento en la susceptibilidad de contraer enfermedades infecciosas como la mastitis (Kimura et al, 2006; Curtis et al, 1984). Durante muchos años, los investigadores han observado que el periodo de transición es crítico para practicar el programa de prevención de mastitis en un hato lechero (Larry Smith y Hogan, ND). En nuestro estudio, el 40% de las vacas testigo presentaron mastitis y el 50% fueron vacas multíparas. En cambio, solo el 13% de las vacas suplementadas con calcio presentaron mastitis. En teoría, este resultado comparativo entre las vacas testigo y las vacas suplementadas con calcio es atribuido a la inmunosupresión hipocalcémica que atraviesa la vaca durante el periodo de transición aunque las diferencias observadas en las concentraciones de calcio sanguíneo no prestan un claro apoyo a dicha explicación en este caso. El hecho que la mastitis se relaciona con la hipocalcemia está bien establecido (Goff, 2008 (B), Houe et al; 2000; Ducusin et al, 2003). La hipocalcemia reduce la contracción muscular, incluyendo la del musculo esfínter responsable del cierre del orificio del pezón después del ordeño, aumentando el riesgo de la entrada de microbios infecciosos (Goff, 2008 (B)). Se ha estimado que las vacas que han padecido de hipocalcemia tienen ocho veces más riesgo de contraer mastitis que una vaca saludable (Curtis et al, 1984), lo

que nos muestra que las vacas que desarrollaron mastitis fueron, en su mayoría, las vacas pertenecientes al grupo testigo las cuales obtuvieron, en general, las concentraciones de calcio menores a los cinco días después del parto.

Tabla 8: Incidencia de mastitis según la edad de la vaca (P o M) y tratamiento (CA o CO).

Mastitis		
Tratadas (CA)	SI	NO
P	1	10
M	3	16
Total	4	26
No- tratadas (CO)	SI	NO
P	4	4
M	8	14
Total	12	18

CA (suplementado con calcio); CO (testigo); P (primípara); M (multípara)

Tabla 9: Incidencia de metritis según la edad de la vaca (P o M) y tratamiento (CA o CO).

Metritis		
Tratadas (CA)	SI	NO
P	0	11
M	2	17
Total	2	28
No- tratadas (CO)	SI	NO
P	1	7
M	2	20
Total	3	27

CA (suplementado con calcio); CO (testigo); P (primípara); M (multípara)

La prevención de retención de placenta y metritis también requieren minimizar la hipocalcemia peripuerperal (DeGaris y Lean, 2009; Goff, 2008; Houe et al, 2000; Ducusin et al, 2003). En el presente estudio, las mismas vacas que tuvieron problemas al parto, presentaron a su

vez metritis. En las contracciones uterinas, el calcio es crucial para un funcionamiento normal y adecuado. En los animales deficientes de calcio en la sangre, las contracciones uterinas en el momento del parto disminuyen drásticamente (López- Bernal, 2003), por lo que las vacas tienden a retener la placenta, aumentando la incidencia de metritis. Sin embargo, nuestros resultados no fueron significativos para determinar que la gel de calcio ejerció efecto alguno para prevenir dichos padecimientos.

7.0 CONCLUSIÓN

En el período cercano al parto las vacas primíparas experimentaron un menor descenso de calcio debido a que por su menor producción de leche durante la lactancia temprana, las cantidades de calcio que tuvieron que movilizar fueron menores que en las vacas multíparas. Suplementar las vacas con una dosis de 54 gramos de gel de calcio una vez después del parto no aumentó la producción de leche durante los primeros 100 días de lactancia, pero sí disminuyó el intervalo entre el parto y el día en alcanzar el pico de producción. Haber suplementado a las vacas con dieta aniónica antes del parto pudo haber alterado los resultados finales evaluativos de la suplementación de calcio debido a que las concentraciones de calcio después del parto no disminuyen tanto como en el caso de las vacas que no se les suplementa con dieta aniónica. El presente estudio no aporta evidencia suficiente para concluir que un tratamiento con gel de calcio en cuestión fue efectivo para fortalecer el nivel de calcio en la sangre y aumentar la producción en la lactancia temprana, pero no se puede descartar la posibilidad de semejante efecto a largo plazo. Suplementar con gel de calcio a las vacas después del parto aparentó tener efectos preventivos contra la mastitis.

8.0 ANEJOS

Edad	Tratamiento	# Vaca	CaA	CaD	Ca5d
M	CA	1	14.2299	9.755	11.8896
M	CO	11	14.0735	13.8911	12.2553
M	CA	16	15.9393	3.7652	12.1452
M	CO	21	11.0136	22.4767	11.9473
M	CO	36	13.946	8.4168	8.5596
M	CO	39	19.9892	15.1195	9.6406
M	CA	41	12.3663	9.5912	11.1241
M	CO	67	9.8786	14.8452	7.4175
M	CA	78	11.7612	13.094	10.2778
M	CA	80	12.6329	13.3761	16.6235
M	CO	82	7.9648	13.0174	14.3784
M	CA	85	12.6796	14.3425	14.1603
M	CO	109	4.1452	8.5035	10.536
M	CO	117	10.6398	12.8529	11.6901
M	CO	119	14.2809	16.8989	12.5675
M	CA	124	12.074	16.3261	10.379
P	CO	128	14.9213	15.875	11.6811
M	CO	132	7.867	9.9011	11.5864
M	CA	134	13.9351	10.2325	15.374
M	CO	137	15.9535	12.8368	10.6452
M	CO	138	10.9508	12.885	5.1729
M	CA	149	22.9536	12.39	14.0492
M	CO	154	7.0479	11.6637	8.1822
M	CA	157	11.5505	13.7852	11.2098
M	CO	168	10.3187	9.1995	11.7882
M	CO	170	15.7115	10.7835	12.1748
M	CO	177	18.2766	17.824	12.3653
M	CO	179	16.4289	13.731	12.5686
M	CA	193	7.225	10.956	12.376
M	CA	195	16.3359	9.2635	8.3913
M	CA	211	12.4778	6.8663	12.3136
M	CA	225	11.8762	10.528	12.0715
P	CA	226	13.7799	12.8945	14.1344
P	CO	228	14.2694	14.3632	11.3783
P	CA	231	10.1243	14.796	12.1351
P	CO	232	15.6393	23.1008	8.9126
P	CO	234	11.408	9.6924	8.7896
M	CA	236	10.8158	9.6599	12.8752

M	CO	237	6.6038	13.5129	12.5734
P	CA	241	10.9188	12.6312	13.2394
P	CO	244	16.0151	13.8493	11.8064
P	CO	260	8.9709	17.5255	13.9271
M	CA	262	11.4695	6.6101	10.2938
P	CA	263	13.7209	10.7941	16.3828
P	CA	275	9.6657	13.5406	25.8037
P	CA	280	13.1324	11.8906	10.5825
P	CA	286	13.012	10.9517	12.3085
P	CA	294	14.4241	12.1428	12.7422
P	CA	303	18.762	11.0922	10.9799
P	CA	304	12.514	9.6977	16.3483
P	CO	307	13.6532	11.5606	21.9821
P	CO	308	14.8987	14.441	13.912
P	CA	311	16.727	9.6205	12.5129
M	CA	762	11.4695	12.9236	16.585
M	CO	770	14.6407	12.4156	12.589
M	CA	1657	14.9105	9.7431	9.6409
M	CA	1818	11.9125	9.9521	13.1501
M	CO	1853	10.4641	13.1867	15.8735
M	CO	1883	5.6996	12.7578	8.6907
M	CO	8095	12.7741	13.0775	11.3604

P (primípara); M (multípara); CA (suplementado con calcio); CO (testigo); CaA (concentraciones de calcio antes del parto); CaD (concentraciones de calcio después del parto); Ca5d (concentraciones de calcio cinco días después del parto)

9.0 BIBLIOGRAFÍA

Aasif M., M. Sarwar, Mahr-un-Nisa. 2008. Influence of Varying Dietary Cation- Anion Difference on Serum Minerals, Mineral Balance and Hypocalcemia in Nili Ravi Buffaloes. *Livestock Science*, Vol. 113, Pag. 52- 61.

Alten J., Moran, A.I. Tsimelzon, M.A. Mastrangelo, S.G. Hilsenbeck, V. Poli and D. Tweardy. 2008. Prevention of Hypovolemic Circulatory Collapse by IL-6 Activated Stat3. *Journal Pone*, Vol. 3, Pag. 1- 10.

Amaral D. 2014. Subclinical Hypocalcemia or Milk Fever, in Dairy Cows- Why All the Fuss? Extension. University of Kentucky.

Beede D.K., C.A Risco, G.A. Donovan, WaC, L.F. Archbald., W.K. Sanchez. Nutritional management of the late pregnant dry cow with particular reference to dietary cation-anion difference and calcium supplementation. N.D. Proceedings of 24th Annual Convention American Association of Bovine Practitioners; Orlando, FL. Stillwater, OK: Frontier Printers; 1992. Pag. 51.

Block E. 1984. Manipulating Dietary Anions and Cations for Prepartum Dairy Cows to Reduce Incidence of Milk Fever. *Journal of Dairy Science*, Vol. 67, Pag. 2939- 2948.

Caroli A., A. Poli, D. Ricotta, G. Banfi and D. Cocchi. 2011. Invited review: Dairy intake and bone health: A viewpoint from the state of the art. *Journal of Dairy Science*. Vol. 94. Pag. 5249- 5262.

Charbonneau, E., D. Pellerin & G.R. Oetzel. 2006. Impact of lowering dietary cation-anion difference in non-lactating dairy cows: A meta- analysis. *Journal of Dairy Science*. Vol. 89. Pag. 537- 548.

Curtis C.R., H.N. Erb, C.J. Sniffen, R.D. Smith, P.A. Powers, M.C. Smith, M.E. White, R.B. Hillman, and E.J. Pearson. 1983. Association of parturient hypocalcemia with eight periparturient disorders in Holstein cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 183:559-561.

Curtis C.R., H.N. Erb, C.J. Sniffen and R.R. Smith. 1984. Epidemiology of parturient paresis: predisposing factors with emphasis on dry cow feeding and management. *Journal of Dairy Sciences*. Vol. 67. Pag. 817-825.

DeGaris P.J. and I.J. Lean. 2009. Milk Fever in Dairy Cows: A Review of Pathophysiology and Control Principles. *The Veterinary Journal*. Vol. 176. Pag. 58- 69.

DeGroot M.A., E. Block, and P. D. French. 2010. Effect of prepartum anionic supplementation on periparturient feed intake, health, and milk production. *Journal of Dairy Science*. Vol. 93. Pag. 5268- 5279.

Dhiman T. R., and V. Sasidharan. 1999. Effectiveness of calcium chloride in increasing blood calcium concentrations of periparturient dairy cows. *Journal of Animal Science*. Vol. 77. Pag. 1597-1605.

Ducusin R.J.T., Y. Uzuka, E. Satoh, M. Otani, M. Nishimura, S. Tanabe and T. Sarashina. 2003. Effects of extracellular Ca²⁺ on phagocytosis and intracellular Ca²⁺ concentrations in polymorphonuclear leukocytes of postpartum dairy cows. *Research in Veterinary Science*. Pag. 27–32.

Fetrow J., K.V. Nordlund and H.D. Norman. 2006. Invited Review: Culling: Nomenclature, Definitions and Recommendations. *Journal of Dairy Science*. Vol. 89. Pag. 1896- 1905.

Fidler A.P., K. VanDevender. N.D.⁴. Heat Stress in Dairy Cattle. Division of Agriculture: Research and Extension. University of Arkansas.

Galetto A. 2012. Situación de la Lechería en América Latina y el Caribe. http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Dairy/Documents/Paper_Lecher%C3%ADa_AmLatina_2011.pdf.

Goff J.P. 1999. Mastitis and retained placenta-relationship to bovine immunology and nutrition. *Adv. Dairy Technol*, Vol. 11. Pag. 185- 192.

Goff J.R. and R.L. Horst. 1993. Oral Administration of Calcium Salts for Treatment of Hypocalcemia in Cattle. *Journal of Dairy Science*, Vol. 76, Pag. 101- 108.

Goff J.P., K. Kimura and R.L. Horst. 2002. Effect of Mastectomy on Milk Fever, Energy, and Vitamins A, E, and β -Carotene Status at Parturition. *Journal of Dairy Sciences*. Vol. 85. Pag. 1427- 1436.

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. *Animal Feed Science and Technology*, Vol. 126, Pag. 237- 257.

Goff J.P. 2008 (A). The Monitoring, Prevention and Treatment of Milk Fever, and Subclinical Hypocalcemia in Dairy Cows. *The Veterinary Journal*, Vol. 176, Pag. 50- 57.

Goff J. P. 2008 (B). Transition cow immune function and interaction with metabolic diseases. In *Proceedings Tri-State Dairy Nutrition Conference*. M. Eastridge (Ed.) Pag. 45-57.

Hernández J., C.A. Risco and 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. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. Vol. 215. Pag. 72-76.

Hibbs J.W., W.E. Kraws, C.F. Monroe and T.S. Sutton. 1946. Studies on Milk Fever in Dairy Cows I. The Possible Role of Vitamin D in Milk Fever. *Journal of Dairy Science*, Vol. 29, Pag.617- 623.

Horst R., J. Goff and T. Reinhardt. 1994. Symposium: Calcium metabolism and utilization. Calcium and Vitamin D metabolism in the dairy cow. *Journal of Dairy Science*. Vol. 77. Pag. 1936- 1951.

Horst R.L., J.P. Goff, T.A. Reinhardt and D.R. Buxton. 1997. Strategies for Preventing Milk Fever in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, Vol. 80, Pag. 1269- 1280.

Houe H., S. Ostergaard, T. Thilising-Hansen, R.J. Jorgensen, T. Larsen, J. Sorensen, and J.Y. Blom. 2000. 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 veterinaria scandinavica*. Vol. 42. Pag. 1-29.

Hurley W.L. and P. Piantoni. N.D. Mammary Gland Development Involution. Mammary Development Resources. Lactation Biology Website. University of Illinois. <http://ansci.illinois.edu/static/ansc438/Mamdevelop/involution.html>.

Jawor P.E., J. M. Huzzey, S. J. LeBlanc and M. A. G. von Keyserlingk. 2012. Associations of subclinical hypocalcemia at calving with milk yield, and feeding,

drinking, and standing behaviors around parturition in Holstein cows. *Journal of Dairy Sciences*. Vol. 95. Pag. 1240–1248.

Kimura K., T. Reinhardt and J. Goff. 2006. Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cows. *Journal of Dairy Sciences*. Vol. 89. Pag. 2588-2595.

Kurosaki M., N. Yamato, O. Mori, F. Imoto, S. Maede, Y. 2007. Preventive Effect of Mildly Altering Dietary Cation- Anion Difference in Milk Fever of Dairy Cows. *Journal of Veterinary Medical Science*, Vol. 69, Pag. 185- 192.

Larry Smith K., and J.S. Hogan. N.D. The physiology of mammary glands during the dry period and the relationship to infection.

Lean I.J., P. J. DeGaris, D. M. McNeil and E. Block. 2006. Hypocalcemia in Dairy Cows: Meta-analysis and Dietary Cation Anion Difference Theory Revisited. *Journal of Dairy Science*, Vol. 89, Pag. 669- 684.

Little E.L. and Wright, N.C. 1925. The etiology of milk fever in cattle. *Brit. J. Exp. Path.* Pag. 129- 134.

Littledike E. T., and R. L. Horst. 1982. Inappropriate plasma 1,25(OH)₂D response to parturient hypocalcemia in cows treated with vitamin D₃, 1,25(OH)₂D₃, or 1,25,26-

(OH)3D3 prepartum. Page 475 in Vitamin D, Chemical, Biochemical and Clinical Endocrinology of Calcium Metabolism. A. W. Norman, K. Schaefer, D.-v. Herrath, and H.-G. Grigoleit, ed. Proc. 5th Int. Workshop on Vitamin D, Williamsburg, VA. W. de Gruyter & Co., New York, NY.

López Bernal A. 2003. Mechanisms of labour—Biochemical aspects. BJOG. Vol. 110. Pag. 39–45.

Mee J.F. and Teagasc. 2008. Prevalence and risk factors for dystocia in dairy cattle: A review. The Veterinary Journal. Vol. 176. Pag. 93- 101.

Moore S.J, M. J. VandeHaar, B. K. Sharma, T. E. Pilbeam, D. K. Beede, H. F. Bucholtz, J. S. Liesman, R. L. Horst, and J. P. Goff. 2000. Effects of Altering Dietary Cation-Anion Difference on Calcium and Energy Metabolism in Peripartum Cows. Journal of Dairy Science, Vol. 83, Pag. 2095- 2104.

Morrill K.M, S. P. Marston, N. L. Whitehouse, M. E. Van Amburgh, C. G. Schwab, D. M. Haines, and P. S. Erickson. 2010. Anionic salts in the prepartum diet and addition of sodium bicarbonate to colostrum replacer, and their effects on immunoglobulin G absorption in the neonate. Journal of Animal Science, Vol. 93, Pag. 2067- 2075.

Mulligan F.J and M.L. Doherty. 2008. Production Diseases of Transition Cow. The Veterinary Journal, Vol. 176, Pag. 3- 9.

N.A.⁵ 1999. Medical Subjects Headings.

https://www.nlm.nih.gov/cgi/mesh/2012/MB_cgi?mode=&term=Bone+Resorption&field=entry.

N.A. 2015. Oficina para la Reglamentación de la Industria Lechera. <http://www2.pr.gov/agencias/Agricultura/Organizaci%C3%B3n/IndustriaLechera/Pages/default.aspx>.

Oetzel G.R. 2003. Calcium Chloride Gel Treatment of Parturient Dairy Cows: Effect on Hypocalcemia and Parturient Diseases. Journal of American Veterinary Medical Association, Vol 223, Pag. 954- 955.

Oetzel G.R. 2004. Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. Vol. 20. Pag. 651- 674.

Oetzel G.R. and B. E. Miller. 2012. Effect of oral calcium bolus supplementation on early-lactation health and milk yield in commercial dairy herds. Journal of Dairy Science, Vol. 95. Pag. 7051- 7065.

Oetzel G.R. 2015. An Update on Hypocalcemia on Dairy Farms. School of Veterinary Medicine. University of Wisconsin-Madison. Pag. 80- 85.

Ostergaard S. and T. Larsen. 2000. Associations between blood calcium status at calving and milk yield in dairy cows. *Journal of Dairy Sciences*. Vol. 83. Pag. 2438–2440.

Phillips C. J. 2010. *Principles of cattle production*. CABI.

Sampson H.A, A. Muñoz- Furlong, R.L. Campbell, N.F. Adkinson Jr, S.A. Bock, A. Branum, S.G. Brown, C.A. Camargo Jr, R. Cydulka, S.J. Galli, J. Gidudu, R.S. Gruchalla, A.D. Harlor Jr, D.L. Hepner, L.M. Lewis, P.L. Lieberman, D.D. Metcalfe, R. O'Connor, A. Muraro, A. Rudman, C. Schmitt, D. Scherrer, F.E. Simons, S. Thomas, J.P. Wood and W.W. Decker. 2006. Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: Summary report—Second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network symposium. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Vol. 117, Pg. 391- 397.

Sorensen J.T, S. Ostergaard, H. Houe and J. Hindhede. 2002. Experts Opinions of Strategies for Milk Fever Control. *Preventive Veterinary Medicine*, Vol. 55, Pag 69- 78.

Stokes S.R. 1998. Anionic Salt Programs for Close- Up Dry Cows. *Agri LIFE EXTENSION*. Texas A&M System. L.5232 12- 98.

Thilsing-Hansen T. and R. J. Jørgensen. 2001. Hot Topic: Prevention of Parturient Paresis and Subclinical Hypocalcemia in Dairy Cows by Zeolite A Administration in the Dry Period. *Journal of Dairy Science*, Vol. 84, Pag. 691- 693.

Thilsing- Hansen T, R. J. Jorgensen and S. Ostergaard. 2002. Milk fever control principles: A review. *Acta Vet. Scand.* Vol. 43. Pag. 1-19.

Van de Braaki A.E, A.T. Van't Klooster, A. Malestein and J.A.J. Faber. 1986. Effects of Low and High Calcium Intake Prepartum on Calcium Mobilization Rate Around Parturition in Dairy Cows. *Veterinary Quarterly*, Vol. 8, Pag. 12-23.

Wu W.X, J.X. Liu, G.Z. Xu and J.A. Ye. 2008. Calcium homeostasis, acid–base balance, and health status in periparturient Holstein cows fed diets with low cation–anion difference. *Livestock Science*, Vol. 117, Pag. 7- 14.