

**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE CIENCIAS CLINICAS VETERINARIAS**

**EFFECTO DE DIFERENTES GRADOS DE CLAUDICACIONES SOBRE ALGUNOS
CONSTITUYENTES SANGUÍNEOS INDICADORES DE ESTRES EN VACAS
LECHERAS.**

Memoria de Título presentada como parte de los
requisitos para optar al TÍTULO DE MÉDICO
VETERINARIO.

SUSSY DEL CARMEN BASTIAS CANDIA

VALDIVIA – CHILE

2006

PROFESOR PATROCINANTE

Dr. Nestor Tadich B.

Firma

PROFESORES CALIFICADORES

Dra. Carmen Gallo St.

Firma

Dr. Marcelo Gomez J.

Firma

FECHA DE APROBACIÓN: 17 de Agosto del 2006

*A mi hermana y hermanos por
su amor incondicional.*

*A mi querida madre, por
su amor, apoyo, paciencia
dedicación y comprensión
durante todos los días
de mi vida.*

INDICE

| Capítulo | Página |
|----------------------------|--------|
| 1. RESUMEN..... | 1 |
| 2. SUMMARY..... | 2 |
| 3. INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| 4. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 16 |
| 5. RESULTADOS..... | 19 |
| 6. DISCUSIÓN..... | 23 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA..... | 27 |
| 8. ANEXOS..... | 35 |
| 9. AGRADECIMIENTOS..... | 40 |

1. RESUMEN

Con el propósito de determinar los cambios producidos por los distintos grados de claudicación en algunos constituyentes sanguíneos indicadores de estrés en vacas lecheras, se realizó un estudio en seis lecherías pertenecientes a la provincia de Valdivia.

Las lecherías fueron visitadas entre Mayo y Septiembre del 2005. Se utilizaron 103 vacas lecheras, las que fueron escogidas de acuerdo a su grado de locomoción, mediante observación directa, a la salida de la sala de ordeña. El grado de locomoción se clasificó en una escala de 0 (sana) a 4 (muy coja). Las vacas seleccionadas fueron ingresadas a un brete de contención donde después de un reposo de diez minutos se procedió a la toma de muestras sanguíneas con tubos de Heparina y NaF mediante venopunción coccígea. A las muestras se le realizaron los siguientes análisis: cortisol (ELISA), Glucosa (GOD-Pap sin desproteinización), Lactato (test UV enzimático), β -Hidroxibutirato (técnica enzimática de oxidación del β -hidroxibutirato a acetoacetato), Hematocrito y Leucocitos (Contador hematológico) y Creatinfosfoquinasa (Método UV-cinético). Los datos fueron ingresados a una planilla EXCEL y analizados en el programa estadístico SPSS 10.0. Para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas para cada variable medida entre los grupos de vacas con diferentes grados de locomoción, se utilizaron pruebas paramétricas, ANOVA de una vía o no paramétricas, Kruskal-Wallis, según correspondiera.

Se observó que los valores de cortisol presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en los animales con grado de locomoción 1 con respecto a los otros grupos. La glucosa presentó valores significativamente ($P < 0,05$) más bajos que los animales de los grupos 3 y 4 de locomoción. Los valores de β - Hidroxibutirato en las vacas con grado 3 de locomoción fueron significativamente más bajos ($P < 0,05$) que los valores de las vacas de los grupos con grado 1 y 0 de locomoción. En cuanto a los valores del Hematocrito se observaron diferencias significativas entre los animales grado 0 y 4 de locomoción. Para el resto de las variables estudiadas no se observó diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$).

Se puede concluir que bajo las condiciones del presente estudio los distintos grados de claudicación no produjeron cambios significativos en los valores de los constituyentes sanguíneos utilizados. Por otra parte es posible que las variables sanguíneas utilizadas no hayan sido las adecuadas para evaluar el estrés producido por las cojeras en vacas de lechería.

Palabras claves: vacas lecheras, claudicaciones, estrés.

Financiado por Proyecto FONDECYT 1040176

2. SUMMARY

EFFECT OF DIFFERENT DEGREES OF LAMENESS ON SOME BLOOD CONSTITUENTS INDICATOR OF STRESS IN DAIRY COWS.

With the aim to determine the changes generated in some blood constituents indicator of stress in dairy cows by different degrees of lameness, a study was carried out in six dairy farms from the province of Valdivia.

The farms were visited between May and September 2005. A total of 103 dairy cows were used, cows were selected by observation of their locomotion score when they walked out of the milking parlour. The locomotion score was classified in a scale of 0 (sound) to 4 (very lame). The selected cows were introduced in a contention crush, where after a rest period of ten minutes, blood samples were collected from the tail vein into heparin and NaF tubes. In the blood samples the following analysis were realized: Cortisol (ELISA), Glucose (GOD-Pap without deproteinization), Lactate (UV enzymatic test), β -Hidroxitubirato (oxidation enzymatic technique of β -Hidroxitubirato to acetoacetate), PCV and Leucocytes (hematologic counter) and Creatininkinase (UV-kinetic method). Data obtained were introduced in an EXCEL data sheet and analysed using the statistical program SPSS 10.0. To determine if there were statically significant differences for each variable measured between cow groups with different locomotion scores, a parametric test, one way ANOVA or non parametric, Kruskal-Wallis test, were used when appropriate.

It was found that values of cortisol have significant differences ($P < 0,05$) in animals with locomotion score 1 as compared to the other groups. Glucose had values significantly lower ($P < 0,05$) than animals with locomotion score 3 and 4. The values of β -Hidroxitubirato in cows with locomotion score 3 were significantly lower ($P < 0,05$) than values from cows with locomotion score 0 and 1. In relation to PCV values, significant differences were only observed between animals with locomotion score 0 and 4. For the rest of the variables studied no statistically significant differences were observed ($P > 0,05$).

Under the conditions of the present study, it can be concluded that the different lameness scores did not induce significant changes in the values of blood constituents analysed. Also, it is possible that these blood constituents, were not adequate to assess stress generated by lameness in dairy cows

Key words: dairy cows, lameness, stress.

Funded by project FONDECYT 1040176

3. INTRODUCCION

3.1. BIENESTAR ANIMAL Y SU RELACIÓN CON LAS CLAUDICACIONES.

Según Broom y Jonson (1993), citado por Bustamante (2001), el bienestar de un individuo se relaciona con los intentos que hace en su ambiente para poder desarrollarse íntegramente. Otra forma de definir el bienestar, es según el grado de sufrimiento y de satisfacción del animal. Para poder evaluar el grado de bienestar de un animal, debe hacerse una diferenciación entre aspectos de tipo conductual, tales como, vocalizaciones, alteraciones en la postura, el mirarse, lamerse o morderse el área afectada y los de tipo fisiológico, donde se producen alteraciones en los procesos biológicos del animal, tales como, presencia o ausencia de enfermedades (Gregory 1998, Carstens y Moberg 2000).

La evaluación del comportamiento como un indicador de bienestar puede indicarnos cómo los animales hacen frente a su ambiente y a su condición fisiológica. Se ha visto que las cojeras modifican el comportamiento normal de las vacas de leche, probablemente debido al dolor. Por ejemplo, al comparar vacas cojas con vacas sanas se ha observado que éstas entran a la sala de ordeña más tarde, se levantan y sacuden sus miembros más frecuentemente, alternan su peso de un miembro al otro más a menudo durante la ordeña, en el potrero pastan por un período más corto de tiempo, tienen una tasa inferior de bocados y permanecen por más tiempo echadas rumiando (Echeverría 2002, O'Callaghan 2002, Juárez y col 2003).

Los animales no deben ser expuestos al dolor o incomodidad en ninguna forma o grado, y sus procesos biológicos deben ser tomados en cuenta al momento de señalar las condiciones de alojamiento y manejo. Sin embargo, cada persona tiene una visión distinta acerca de las obligaciones frente a los animales (Fraser y Broom 1997). La valoración del bienestar está basada en la lógica de las 5 libertades, las que entregan una comprensión del sistema de evaluación del bienestar de cualquier animal en términos de su estado de nutrición, confort, salud, temperamento y comportamiento. Las cinco libertades son una serie de metas hacia las que los dueños de los animales y negociantes deberían esforzarse en alcanzar.

Estas libertades son:

- Ausencia de hambre y sed; libre acceso a agua dulce y a una dieta para mantener la salud y la fuerza.
- Ausencia de incomodidad, entregando un ambiente adecuado, que incluya refugios y áreas confortables.
- Ausencia de daño, dolor o enfermedad, con prevención, rápidos diagnósticos y tratamientos adecuados.
- Libre de expresar su comportamiento normal, otorgando suficientes espacios, instalaciones

- adecuadas y la compañía de otros animales.
- Ausencia de angustia y miedo.

Las cinco libertades de los animales están basadas en la percepción de que los animales sienten como nosotros el hambre, sed, miedo, frío y dolor, esto no implica que los animales deban estar libres de sufrir algún grado de estrés, pero si un animal enfrenta situaciones estresantes demasiado severas, complicadas o prolongadas y no logra tomar alguna acción preventiva para aliviar ese cuadro de estrés, aparecen los efectos adversos (Fraser y Broom 1997, Gregory 1998, Webster 2001).

Webster (2001), describe una lista de problemas que son innatos en los sistemas de producción, la cual incluye un elemento importante que no se encuentra inserto en las 5 libertades, y corresponde al concepto de cansancio, ya que los animales deben continuar produciendo aunque se sientan físicamente agotados. Estos problemas son:

- apetito o enfermedades metabólicas agudas.
- Incomodidad crónica, como malas camas, o pérdida de condición.
- Aumento de enfermedades, por sobre exposición a patógenos o disminución de la inmunidad.
- Ansiedad crónica o frustración, establos o pesebreras inapropiadas, etc.
- Cansancio metabólico y/o físico, debido a producciones prolongadas y excesivas.
- Dolor crónico o restricción del movimiento, debido a la alteración de partes del cuerpo o de sus funciones. Ej. claudicaciones en vacas lecheras.

Las claudicaciones son afecciones multifactoriales, siendo sus factores de riesgo prácticas de alimentación, medio ambiente, procesos infecciosos, la genética y el comportamiento tanto animal como humano (Vermunt 1992, Meyer y col 1998, Berry 1999, Acuña 2002). La mayoría de los autores concuerdan que entre el 75% y el 90% de los casos las enfermedades claudicógenas se ubican de preferencia en los dedos, siendo el 85% en los miembros posteriores y el mismo porcentaje en la pezuña lateral (Fitzgerald y col 2000, O'Callaghan 2002, Tadich y col 2005). Las cuatro patologías más frecuentemente encontradas en las provincias de Valdivia, Osorno y Llanquihue, fueron: las deformaciones crónicas de la pezuña, seguidas por lesiones de la línea blanca, lesiones de muralla y doble suela (Tadich y col 2005).

Tadich y col (2005) y Flor (2006), señalan que alrededor de un 9% de las vacas lecheras presentan algún problema de claudicación en algún momento del año, por lo que se podría estimar que aproximadamente 34.300 vacas cursan con al menos un episodio de cojera al año en la Décima Región, y teniendo en cuenta que en esta Región se concentra el 61,5% de la masa ganadera lechera nacional (1.587.557 cabezas) las que producen el 66% (951 millones de litros) de la producción total (Chile, 1997), las cuales pueden disminuir su producción láctea entre un 20% a un 50%, con reducciones en la producción que van desde 1,5 litros diarios en las primeras semanas hasta 360 kilos en lactancias estandarizadas de 305 días, de esta forma podemos evidenciar el impacto que tienen las claudicaciones en la producción lechera nacional (Rehbun y col 1980, Green y col 2002).

Debido a la intensificación de la producción láctea, se ha producido un incremento en la incidencia y prevalencia de las claudicaciones transformándolas en uno de los principales problemas de bienestar animal, siendo sólo superadas por problemas reproductivos y mastitis (Vermunt 1999, Galindo y col 2000, Webster 2001, Tadich y col 2005).

Las claudicaciones del ganado lechero producen pérdidas económicas debido a: disminución en la producción y descarte de leche por tratamientos efectuados; ineficiencia reproductiva (principalmente por fallas en la detección de estros); aumento de la tasa de eliminación con el consiguiente riesgo de decomiso parcial o total de la canal, sumado a la disminución en la condición corporal; aumento de los costos veterinarios; aumento en los costos de la mano de obra, por el cuidado, tratamiento y tiempo adicional que necesitan los animales afectados (Rehbun y col 1980, Sprecher y col 1997, Webster 2001, Gómez y col 2003).

Si bien las claudicaciones han sido estudiadas desde el punto de vista de los factores causales, existe poca información acerca de su implicancia en el bienestar animal; a pesar de que está establecido que corresponden a condiciones debilitantes que producen dolor, estando, generalmente, asociadas a daño de tejidos, manifestándose con un caminar dificultoso que disminuye la capacidad de desplazarse libre y cómodamente o incluso el mantenerse de pie, inhabilitándolas para competir por agua y alimento reduciendo así su consumo (Münzenmayer 1997, Barielle y col 2000, O'Callaghan 2002, Tadich 2004).

En el Farm Animal Welfare Council (1997), se establece que el dolor experimentado por el ganado cojo tiene un impacto sustancial en el bienestar animal, indicando que la cojera es una condición en extremo dolorosa y que se debe reducir su incidencia en forma urgente. Se ha visto que la cojera disminuye el umbral de dolor debido a cambios a nivel local (en el sitio de la inflamación) y central del sistema nervioso mostrándose hipersensibles a estímulos nocivos y en algunos casos presentando hiperalgesia hasta 28 días después del tratamiento y la desaparición aparente de la cojera (Logue y col 1998, Whay y col 1998, O'Callaghan 2002, Vermunt 2005, Tejeda 2006).

Los animales con claudicaciones están sujetos a dolor e inflamación especialmente si la claudicación pasa desapercibida por largos periodos de tiempo llevando a que cursen con cuadros de cronicidad (Manson y Leaver 1988). Al igual que con muchos problemas físicos mediante una detección temprana de las cojeras, éstas pueden corregirse, realizando tratamientos adecuados y previniendo que la claudicación se desarrolle en un problema serio o crónico afectando el bienestar y el desempeño del animal (Clarkson y col 1996, Scott 1996, Logue y col 1998). El método más común de detección de las claudicaciones involucra la observación de las vacas, poniendo especial atención en anomalías obvias en el modo de andar.

En muchos casos de claudicaciones, los agricultores esperan que los animales mantengan sus rendimientos de producción (Zimmerman 2001, Hettich 2003) generando un fuerte grado de estrés para el animal, debido a que el dolor siempre está presente en las afecciones podales.

3.2. FISIOPATOLOGIA DEL ESTRES

El dolor producido por las claudicaciones, es considerado el quinto signo clínico de un cuadro de estrés junto a la temperatura rectal, pulso, frecuencia respiratoria y presión sanguínea (Muir y col 2004). La presencia o ausencia de algún grado de estrés es el indicador más importante y utilizado de bienestar animal. El estrés es usado para indicar alguna condición ambiental adversa, pudiendo tener un origen climático, nutricional, social, fisiológico, infeccioso o tóxico, por lo tanto es considerado un evento anormal e indeseable (Stott 1981).

El término estrés fue introducido por Hans Selye en el año 1935, quien descubrió, los estímulos que podían provocar esta condición, como la activación del Eje Hipotalámico-Hipofisiario-Adrenal; éste autor definió el estrés como “*la acción de estímulos nerviosos y emocionales provocados por el ambiente sobre los sistemas nervioso, endocrino, circulatorio y digestivo de un animal, produciendo cambios medibles en los niveles funcionales de estos sistemas*” (Bustamante 2001, Lay y Wilson 2001). Selye (1973), citado por Caballero y Sumano (1993), señaló que el estrés presenta una relación positiva entre la agresividad del medio externo y la magnitud de la respuesta orgánica del individuo, siendo una reacción de defensa ante los agentes inductores de estrés, los cuales son detonadores de respuestas orgánicas capaces de desequilibrar los mecanismos reguladores de la homeostasis. Se ha discutido la existencia de una respuesta específica frente al estrés, y se ha sugerido que tanto las respuestas conductuales como fisiológicas muestran un alto grado de especificidad según el factor estresante (Herskin y col 2004).

Stott (1981), propone que el mecanismo de respuesta al estrés está basado principalmente en dos conceptos básicos: el Síndrome de Emergencia descrito por Walter Cannon en 1932, que involucra al Sistema Simpático-Adrenal, en el cual el organismo se

prepara para hacer frente a peligros inminentes generando la respuesta de “lucha y huida”, llamada hoy en día respuesta simpática-suprarrenal, la cual posibilita a un animal a actuar inmediatamente frente a un factor estresante, de esta forma se produce una activación neuronal en el hipotálamo que causa la liberación de adrenalina desde la médula suprarrenal, aumenta el ritmo cardíaco, la disponibilidad de glucosa, y aumenta tanto la presión, como el volumen sanguíneo, el cual es reencauzado fuera de los órganos no esenciales hacia el corazón y los músculos estriados, a fin de que el animal pueda responder peleando o escapando de la amenaza (Lay y Wilson 2001). El segundo concepto es el Síndrome General de Adaptación de Selye, que corresponde a una teoría de adaptación a un estrés biológico y consta de tres fases: i) respuesta inmediata, mediada por el sistema simpático; de carácter automática, defensiva y antiinflamatoria, se produce un aumento de la frecuencia cardíaca, contracción esplénica con liberación de glóbulos rojos, aumento de la capacidad respiratoria y aumento de la coagulación sanguínea. Es una respuesta de duración limitada caracterizada por una gran liberación de glucocorticoides al torrente sanguíneo, ii) resistencia, en esta etapa el organismo intenta superarse, adaptarse o afrontar la presencia de los factores que percibe como una amenaza o agente nocivo, en esta fase hay una participación del eje hipotálamo-hipófisis y corteza adrenal, ocurre una normalización de los niveles de corticoesteroides y tiene lugar una desaparición de la sintomatología y finalmente iii) reacción de agotamiento, que ocurre cuando el estímulo crónico se repite con frecuencia o es de larga duración sobrepasando los niveles de resistencia aumentando la actividad endocrina produciendo efectos dañinos sobre los sistemas y aparatos pudiendo terminar con la muerte del individuo (Axelrod y Reisine 1984, Friend 1991, Caballero y Sumano 1993).

Sin embargo, Bohus (1987) citado por Tadich y col (2005), indica que las tres fases que presenta el SGA de Selye no representan fielmente la realidad animal, ya que, éstos presentan reacciones diferentes a los humanos en cuanto a la percepción del ambiente, estrés y adaptación.

Como se describió anteriormente la respuesta fisiológica ante una situación de estrés supone la activación de dos sistemas principalmente, uno de ellos es el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal, el cual en respuesta a un factor estresante como el dolor, trauma o frío segrega la hormona Corticotrofina (CRH) que actúa sobre la hipófisis y provoca la liberación de la Adenocorticotrofina (ACTH). En respuesta al estrés los niveles de ACTH aumentan desde 5 a 100 veces sobre los niveles basales alcanzando un máximo entre los 10-15 minutos dependiendo de la duración y la intensidad del estímulo, una vez liberada a la circulación parece tener una vida media de 6-7 minutos, en la circulación periférica da lugar a la producción de glucocorticoides, principalmente cortisol a nivel de la corteza suprarrenal. La secreción de cortisol no es continua sino de carácter episódico, su secreción es intermitente durante cortos períodos de tiempo y la separación entre los picos puede durar incluso varias horas.

El otro es el Sistema Nervioso Simpático, en el cuál se generan impulsos nerviosos, seguidos por una respuesta de carácter rápida y breve, que conlleva a la liberación de

adrenalina y noradrenalina, que mantienen la homeostasis del organismo. Ambas son las encargadas de poner al cuerpo en estado de alerta, preparándolo para luchar o huir, aumentan la frecuencia cardiaca, la vasoconstricción periférica, la glicemia, la dilatación pupilar, producen aumento de la ventilación y de la coagulabilidad de la sangre, aumentan la producción de tiroxina e inhiben la secreción de prolactina (Axelrod y Reisine 1984, Breazile 1987, Currie 1988, Friend 1991, Lay y Wilson 2001, Möstl y Palme 2002, Lager y col 2004).

Si bien, el estado de estrés tiene la capacidad de provocar una abundante descarga hormonal desde la glándula suprarrenal y fibras terminales nerviosas respectivamente, la liberación de acetilcolina antagoniza los efectos de adrenalina y noradrenalina evitando un desbalance entre los dos sistemas que pudiera poner en peligro la vida (Cruz y Vargas 1998).

Los glucocorticoides aumentan la glucosa disponible en el cuerpo ya sea destruyendo proteína, glicógeno o grasa, facilitando así la gluconeogénesis y suprimiendo la utilización de glucosa en la circulación periférica. Deprimen el sistema inmune, inhibiendo la síntesis de casi todas las citoquinas conocidas y alterando el crecimiento y la diferenciación de las células inmunes (Lay y Wilson 2001, Lager y col 2004).

Otras hormonas que están presentes son la aldosterona y la anti-diurética, ambas fomentan la retención hidrosalina creando un mecanismo adaptativo en presencia de hemorragias o deshidrataciones por sudoración excesiva, por otro lado las β -endorfinas que corresponden a péptidos opioides producidos en la Hipófisis, elevan el umbral de tolerancia a los estímulos dolorosos. Se ha visto que en muchas especies como ovinos, porcinos y humanos, el dolor y el estrés causan un significativo aumento en las concentraciones plasmáticas de β -endorfinas (Friend 1991, Tume y Shaw 1992, Möstl y Palme 2002).

Los estados de estrés pueden ser medidos a través de variables sanguíneas sean éstas hormonas o metabolitos, la ventaja de estas mediciones es que producen resultados cuantificables y posibles de comparar (Tadich 2004). Entre los indicadores sanguíneos de estrés más comúnmente utilizados se puede mencionar el Cortisol, Catecolaminas, Factor Liberador de corticotropina, metabolitos como Glucosa, β -Hidroxiacetato, Creatinfosfoquinasa y Lactato los que pueden ser adecuados para la evaluación del estrés, si se les correlaciona con variables fisiológicas como temperatura corporal, frecuencia cardiaca, respiratoria, hematocrito y relación neutrófilos/linfocitos (Caballero y Sumano 1993, Alvarado 1999, Tadich y col 2000, Tadich 2004). La capacidad de adaptación y la complejidad de las respuestas fisiológicas de un individuo se esquematiza en la figura 4, según una modificación de Caballero y Sumano (1993), citado por Echeverría (2002).

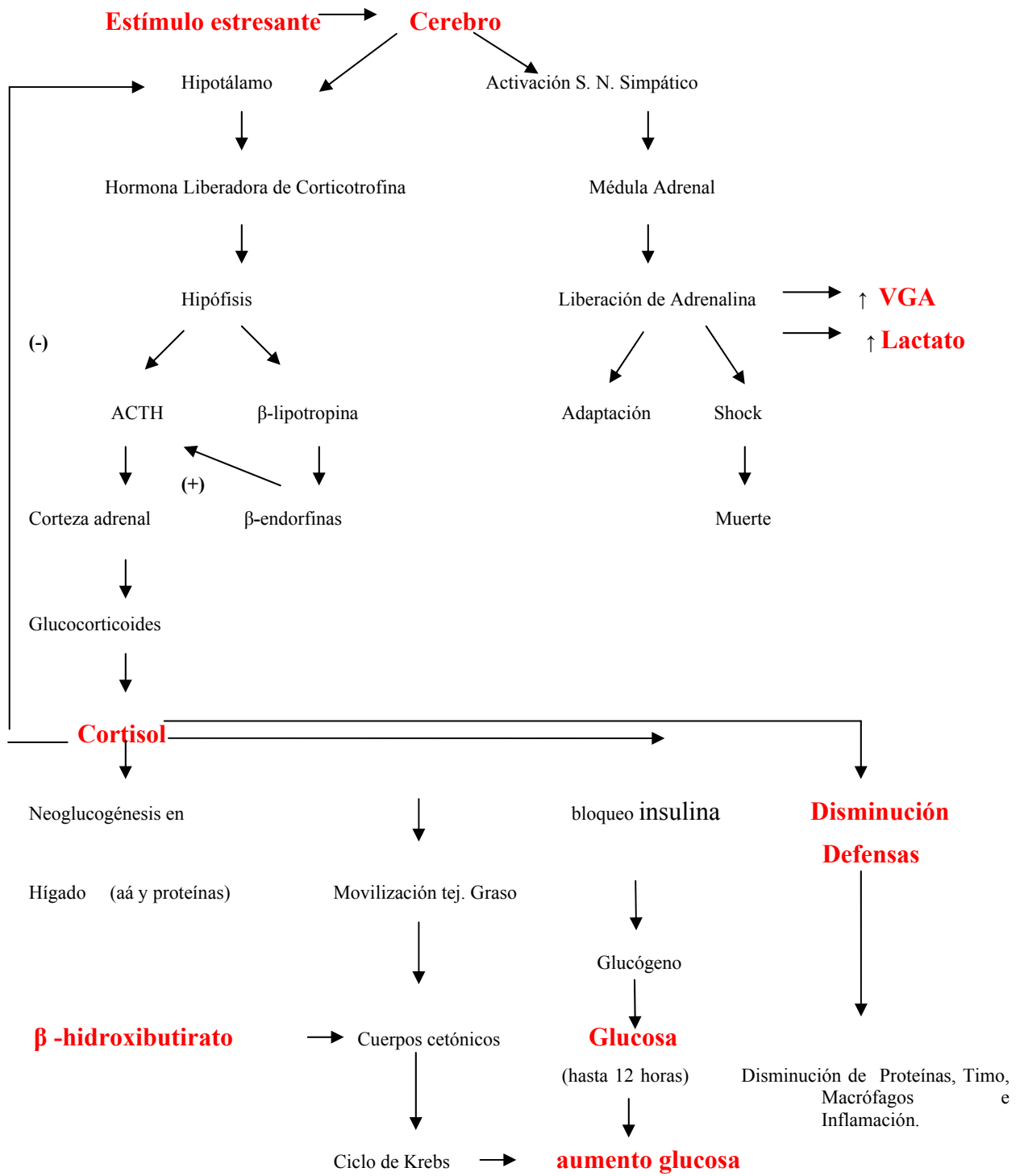


Figura 1. Fisiopatología del estrés (Echeverría 2002).

3.3. - CONSTITUYENTES SANGUÍNEOS INDICADORES DE ESTRÉS

3.3.1.-Cortisol:

Es el principal glucocorticoide secretado en respuesta a ACTH por parte de la hipófisis desde la zona fascicular y reticular de la corteza adrenal, y sus valores sanguíneos son ampliamente reconocidos como parámetros fisiológicos de estrés, siendo un buen indicador de cuadros de estrés agudo, aunque su aumento sólo sería un indicador neuroendocrino primario (Moberg 1987, Alvarado 1999, Palme y col 2000, Mellor y col 2002). Su transporte en la sangre depende de su unión a proteínas plasmáticas, tales como la globulina ligante de corticoides o transcortina (75%) y albúmina (10%), el 10% restante se encuentra libre. La vida media de eliminación del cortisol es de 60 minutos aproximadamente y se elimina por la orina (75%) y las heces (25%), por lo cual el hígado juega un rol importante en la modificación de esta hormona, y en menor proporción los riñones (Alvarado 1999, Cunningham 1999, Morrow y col 2002, Lager y col 2004). Hay que tener presente que el cortisol presenta un ritmo ultradiano y circadiano en vacas lecheras, el ritmo ultradiano corresponde a oscilaciones en los niveles de esta variable cada 120 minutos, en cuanto al ritmo circadiano este indica que los valores tanto de ACTH y de cortisol son más bajos a media noche y más altos a las 6:00 a.m. (Thun y col 1981, Lefcourt y col 1993, Cunningham 1999).

Los glucocorticoides influyen el metabolismo de los carbohidratos, aumentando la gluconeogénesis hepática lo que lleva a generar hiperglicemia, suprimiendo así la utilización de glucosa en la circulación periférica; promueven el catabolismo proteico; poseen una función de lipólisis, lo que resulta en liberación de ácidos grasos libres y glicerol. Por otra parte, tienen un efecto negativo en el sistema inmune e interfieren en la respuesta inflamatoria (Coles 1986, Álvarez 2002, Cunningham 1999, Lager y col 2004). Oyarce y col (2002), señalan que la concentración plasmática promedio de cortisol en vacas es de $1,4 \pm 1,2$ $\mu\text{g/dl}$.

Los valores de cortisol sanguíneo han sido reconocidos como indicadores de estrés y de dolor, ya que cambios en la concentración de cortisol, si bien no miden exactamente cuanto dolor está sintiendo ese animal, entregan información acerca de la nocividad del factor (Morton y Griffiths 1985, Palme y col 2000, Moberg y Mench 2005). El aumento del cortisol es fundamental para desencadenar el mecanismo de adaptabilidad del animal frente a un factor estresante, movilizandando grasas y regulando la respuesta inflamatoria en el caso de alguna lesión; sin embargo, se ha visto que los aumentos sostenidos de cortisol son perjudiciales, disminuyendo el crecimiento, la producción láctea, suprimiendo el sistema inmunológico y generando atrofia de tejidos (Morrow y col 2002).

La respuesta de los glucocorticoides al estrés es inmediata, las concentraciones de cortisol aumentan rápidamente hasta alcanzar, en minutos, valores varias veces superiores a los normales, siendo proporcionales a la gravedad del estrés (Ley y col 1996, Cunningham 1999). Se ha visto que en la mayoría de los manejos de animales de granja se produce un

aumento en las concentraciones sanguíneas de cortisol a medida que aumentan los niveles de estrés (Ley y col 1991, Ley y col 1996). En los casos de laminitis crónica en vacas, los niveles de cortisol fueron significativamente mayores comparadas con vacas clínicamente sanas (Belge y col 2004).

3.3.2. - Glucosa:

La glucosa constituye la principal fuente de energía en el organismo, participando además en la síntesis de aminoácidos y ácidos grasos como también formando parte estructural de glicolípidos y glicoproteínas (Wittwer y Böhmwald 1983). La glucosa depende principalmente de los niveles de insulina en el organismo, por lo tanto sin insulina su metabolismo normal se elimina casi por completo y las células deben depender de la gluconeogénesis; es la principal sustancia empleada por la glándula mamaria para formar lactosa, principal azúcar de la leche (Frandsen y Spurgeon 1995). La glucosa se almacena en el cuerpo en forma de glucógeno (Cunningham 1999), el cual se forma anabólicamente por el proceso denominado glucogénesis en los hepatocitos y en las células del músculo estriado voluntario (Frandsen y Spurgeon 1995). Valores promedio de glucosa en bovinos son de 3,0-4,4 mmol/L (Wittwer y Böhmwald 1983).

Una de los efectos más importantes del aumento de glucocorticoides es el incremento en los valores de glucosa, en respuesta a algunos factores estresantes severos, llevando a una hiperglicemia. Este aumento de los valores ocurre principalmente por una inhibición de la absorción de esta variable en los tejidos periféricos, en particular en las células musculares y adiposas, redistribuyéndola hacia músculo estriado, cerebro y otros tejidos finos y favoreciendo la gluconeogénesis hepática (Cunningham 1999). Por otro lado, el aumento de la glucosa sanguínea puede estar dado por el incremento de los niveles de catecolaminas circulantes las cuales son necesarias para la mantención de la respuesta de huida, éstas inhiben la utilización de la insulina aumentando los valores de glucosa sanguínea circulante. Sin embargo, no hay información de estados intermedios entre la intensidad de respuesta al estrés y los niveles de glucosa sanguínea en bovinos. La glucosa sanguínea no es un indicador muy confiable de la intensidad del estrés en animales, ya que sus niveles pueden ser alterados por diversos factores (Mudron y col 2005).

3.3.3. - Lactato:

El lactato o ácido láctico es un producto del metabolismo anaeróbico de los carbohidratos y deriva principalmente de las células musculares y glóbulos rojos. El glucógeno al ser transformado a través de la vía glicolítica en piruvato, puede ser usado para la generación de ATP o convertido en lactato (Gregory 1998). Según Gregory (1998), las reservas de glucógeno hepático se agotan entre las 12 a 24 horas posteriores al ayuno, de esta

manera los niveles de lactato y piruvato producidos por el músculo aumentan para luego pasar a la sangre favoreciendo la gluconeogénesis para así poder mantener la glicemia del organismo. Los valores de lactato pueden aumentar debido a anoxias secundarias a condiciones de shock, neumonías e insuficiencias cardíacas congestivas, también pueden aumentar en cuadros de insuficiencia renal y leucemias. La deficiencia de tiamina puede producir un incremento en los valores de este metabolito (Frandsen y Spurgeon 1995). Por lo tanto hay que considerar que esta variable es fácilmente influenciada por diversos factores, tanto relacionados con el manejo, como por factores individuales, debido a esto el lactato, podría no ser un buen indicador de estrés (Tadich y col 2003). Los valores de referencia para la especie bovina van desde 0,6-2,2 mmol/l (Radostits y col 2000).

3.3.4. – β -Hidroxibutirato (β -HBA):

Los cuerpos cetónicos están constituidos por metabolitos intermediarios del metabolismo de las grasas, como son el ácido acético, acetona y β -hidroxibutirato, los cuales funcionan como sustitutos energéticos que sirven de una manera similar a la glucosa utilizada por los monogástricos, ya que aportan un 60-80 % de la energía a la dieta de los rumiantes (Wittwer y Böhmwald 1983, Cunningham 1999). El butirato es el principal precursor del β -HBA el cual se produce a nivel del epitelio ruminal y como un producto intermediario del metabolismo de las grasas endógenas, es producido en el hígado de los rumiantes y no rumiantes. Cuando la cantidad de grasa movilizada excede la capacidad de oxidación del hígado, se produce un incremento de los cuerpos cetónicos (β -hidroxibutirato) (Contreras 1998). La concentración sanguínea de este metabolito en esta especie alcanza a $0,41 \pm 0,03$ mmol/L (Kaneko 1997).

Las cojeras pueden resultar en una pérdida de peso, produciéndose un aumento en las concentraciones de β -hidroxibutirato en la sangre, como respuesta a la falta de alimento (Warriss y col 1995).

3.3.5. - Hematocrito (VGA):

Wittwer y Böhmwald (1983), lo definen como el porcentaje del volumen de la sangre que está dado por los eritrocitos y su valor depende fundamentalmente del número de eritrocitos y de su tamaño, además constituye la prueba aislada más útil en hematología por la información que entrega y por su facilidad, costo y exactitud (Coles 1986). Su valor en la especie bovina varía de 24 – 46 % (Wittwer y Böhmwald 1983).

El aumento del Hematocrito puede deberse principalmente a dos factores, i) una contracción esplénica, por estimulación simpático adrenal o por un aumento de las catecolaminas circulantes y ii) el movimiento de fluidos fuera del compartimiento vascular (Alvarado 1999). Según Blood y col (1992), existen dos causas principales de deshidratación, una es la ingesta insuficiente de agua y otra la pérdida de la misma. Los bovinos con afecciones podales disminuyen su desplazamiento con el objeto de evitar el dolor producido por la cojera, de esta forma podrían disminuir su consumo de agua, por otra parte los glucocorticoides liberados en cuadros de estrés debido a dolor inducen un proceso de diuresis, inhibiendo la actividad de la vasopresina a nivel del túbulo distal e incrementando la velocidad de filtración glomerular favoreciendo de esta manera la pérdida de agua y el aumento del hematocrito (Cunningham 1999).

3.3.6. – Creatinfosfoquinasa (CK, EC 2.7.3.2.):

Corresponde a la enzima más frecuentemente usada en suero para la determinación de enfermedades musculares en los animales domésticos. En el músculo esta enzima actúa haciendo que el ATP sea mejor aprovechado en la fase de contracción, por la fosforilación del ADP (Kaneko 1997). Aparece en la circulación plasmática como resultado de daño tisular y es relativamente órgano específico (Álvarez 2002). La enzima es liberada desde el músculo esquelético como respuesta a cambios en la permeabilidad de la membrana celular y llega en pulsos a la circulación desde el tejido dañado durante un fuerte ejercicio o como resultado de daño producido por contusiones (Alvarado 1999). Los valores de referencia para el bovino varían entre 35-280 U/L (Radostits y col 2000).

3.3.7. - Leucocitos:

Nombre genérico que se les da a las diferentes células blancas nucleadas de la sangre, incluyendo neutrófilos (18-40%), monocitos (2-8%), eosinófilos (5-18%), basófilos (0-2%) y linfocitos (45-65%), todos ellos participan en mecanismos de defensa del organismo, pero son cinética, morfológica y funcionalmente diferentes. Los leucocitos son importantes para las respuestas inmunitarias y alérgicas del cuerpo. El estudio de los cambios en el número y morfología de los leucocitos es de gran utilidad para orientarse sobre la naturaleza y gravedad de una patología (Wittwer y Böhmwald 1983).

El aumento de los glucocorticoides debido al estrés produce un aumento en la liberación de neutrófilos maduros desde la médula ósea, disminuyendo su paso desde la sangre a los tejidos y aumentando la migración del pool circulante ubicado en las paredes de los vasos sanguíneos y tejidos cercanos a la circulación (Álvarez 2002, Tadich y col 2003). La magnitud de este aumento disminuye con el tiempo, pero se ha demostrado que en cuadros de

estrés crónico se produce leucocitosis mediada principalmente por una neutrofilia, mientras que los valores de linfocitos y eosinófilos disminuyen, los cuales persisten mientras las concentraciones de glucocorticoides permanezcan elevadas (Álvarez 2002, Yagi y col 2004). El valor de referencia en bovinos es de 5-9 mil/ μ l (Wittwer y Böhmwald 1983).

Por otro lado, los glucocorticoides modulan tanto a los mediadores del sistema inmune como los del proceso antiinflamatorio: prostaglandinas, leucotrienos, quininas, serotonina e histamina. Se ha visto que la interacción del sistema inmune con el sistema endocrino no es solo de una vía, sino que sería una comunicación bidireccional, ya que se ha visto que inflamaciones o lesiones en los tejidos generan una producción de citoquinas, las cuales activan el eje hipotálamo-adrenal incrementando las concentraciones de glucocorticoides, los cuales inhiben tanto la producción como la acción de estas sustancias (Kaneko 1997, Lay y Wilson 2001).

Basado en los antecedentes planteados y sumado al creciente interés científico en cuantificar el estrés producido por las cojeras en las vacas lecheras y su implicancia en el bienestar animal de estos animales se plantearon las siguientes hipótesis de trabajo.

Hipótesis:

H_{a1}: Las claudicaciones en las vacas de lechería producen un aumento en los valores de algunos constituyentes sanguíneos indicadores de estrés.

H_{a2}: Las concentraciones de algunos constituyentes sanguíneos indicadores de estrés aumentan a medida que se incrementa el grado de claudicación que presentan las vacas.

Para comprobar o rechazar estas hipótesis se plantearon los siguientes objetivos.

OBJETIVOS

Objetivo General:

1. Evaluar el bienestar animal en vacas lecheras mediante la determinación de las concentraciones de algunos constituyentes sanguíneos indicadores de estrés.

Objetivo Específico:

1. Determinar y comparar las concentraciones sanguíneas de cortisol, glucosa, lactato, β -hidroxibutirato, hematocrito, creatinfosfoquinasa y leucocitos en vacas lecheras con distintos grados de cojeras y clínicamente sanas.

4. - MATERIAL Y MÉTODOS

4.1.- Material:

4.1.1.- Material Biológico:

Se utilizaron 103 vacas lecheras raza Frisón Negro con distintas producciones y distintos estados de lactancia, pertenecientes a seis lecherías de la provincia de Valdivia. Las lecherías contaban con registros de producción de leche, registros de cojeras y brete de contención. Las vacas se dividieron en cinco categorías de acuerdo al grado de locomoción que presentaban: grado 0 (n=35), grado 1 (n=18), grado 2 (n=21), grado 3 (n=21) y grado 4 (n=11).

4.1.2. - Material Físico:

Tubos al vacío vacutainer® con heparina (10 ml) y NaF (5 ml), soportes y agujas para la obtención de las muestras de sangre.

Brete de contención.

4.2. - Método:

Las lecherías fueron seleccionadas por conveniencia, para lo cual se solicitó la cooperación de los propietarios de seis predios de la provincia de Valdivia, con los cuales se programaron las visitas mediante contacto telefónico, explicándoles el objetivo del trabajo. El número de visitas a cada predio dependió de la cantidad de animales cojos que había en ellas, y se realizaron durante el periodo de mayo a septiembre del 2005.

Durante cada visita se determinó el grado de locomoción y miembro afectado de todos los animales a la salida de la sala de ordeña mediante observación directa, siendo utilizadas solo aquellas vacas que presentaran alteraciones en los miembros posteriores. El grado de locomoción se clasificó en una escala de 0 a 4 de acuerdo a la pauta utilizada por Tadich y col (2005):

- Locomoción **Grado 0**: la vaca se encuentra sana.
- Locomoción **Grado 1**: la vaca se encuentra parada normalmente, pero arquea el lomo al caminar. La vaca presenta una claudicación apenas perceptible al desplazarse y trata de disminuir la fuerza de apoyo con el miembro afectado.
- Locomoción **Grado 2**: la vaca al estar parada o caminando arquea el lomo, lo que se interpreta como una claudicación evidente. La disminución de la fuerza de apoyo se hace más evidente, demostrando una claudicación manifiesta al desplazamiento.
- Locomoción **Grado 3**: existe dificultad para caminar, y la vaca intenta no apoyar el miembro afectado. Es una claudicación grave. El animal prácticamente no apoya el miembro afectado y se le dificulta el movimiento.
- Locomoción **Grado 4**: es una claudicación severa. La vaca rehúsa levantarse o caminar por iniciativa propia y prefiere el decúbito.

La selección de las vacas grado 0 de locomoción se realizó mediante registros, las cuales debían ser similares en número de partos y en estado de lactancia a las vacas con grados de locomoción 1, 2, 3 y 4.

Las vacas utilizadas fueron introducidas a un brete de contención dejándolas en reposo por 10 minutos, luego de los cuales se les determinó la frecuencia respiratoria (ciclos/minuto), la frecuencia cardíaca (latidos/minuto) y temperatura rectal (°C), (estos antecedentes fueron utilizados en otra Memoria de Título (Tejeda 2006)). Posteriormente, se procedió a tomar dos muestras de sangre mediante venopunción coccígea con tubos al vacío con Heparina y NaF los cuales fueron transportados el mismo día al Laboratorio de Patología Clínica del Instituto de Ciencias Clínicas de la Universidad Austral de Chile, donde fueron centrifugados y el plasma fue almacenado a -20°C, para su posterior análisis.

Las muestras de sangre para la determinación de cortisol, β -hidroxibutirato, creatinfosfoquinasa, VGA, y leucocitos se obtuvieron con tubos al vacío con heparina, mientras que las muestras para determinar lactato y glucosa se obtuvieron con tubos al vacío con NaF. Los análisis de los constituyentes sanguíneos se hicieron de acuerdo a los siguientes métodos:

- Cortisol: la determinación ($\mu\text{g}/\text{dl}$) se realizó mediante ELISA en el Laboratorio de Fisiología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Concepción, para lo cual se envió plasma congelado a -20°C.
- Glucosa (mmol/L): la concentración sanguínea se determinó por medio de la prueba GOD-Pap, sin desproteinización n° artículo 2623, de RANDOX® y un autoanalizador Cobas Mira Plus (Roche®).

- Lactato (mmol/L): se determinó mediante la técnica basada en el test UV enzimático, n° artículo 182287 de Roche® y un autoanalizador Cobas Mira Plus (Roche®).
- β -hidroxibutirato (mmol/L): la concentración sanguínea fue determinada mediante una técnica enzimática que consiste en la oxidación de β -hidroxibutirato por medio del NAD⁺ (Nicotinamida adenin dinucleótido) mediante la enzima 3 HBDH (3- hidroxibutirato deshidrogenasa) a acetoacetato, la cantidad de NAD⁺ reducido se midió con un espectrofotómetro HITACHI 4020.
- Creatinfosfoquinasa (U/L): la determinación de la actividad plasmática se realizó mediante el método UV-cinético, a 340nm y 37°C, optimizado según ECCLS Y IFCC de HUMAN. Se emplearon reactivos n° artículo 12015 y un autoanalizador Cobas Mira Plus (Roche®).
- VGA (%) y Leucocitos (miles/ μ l). la determinación se realizó utilizando un contador hematológico Sysmex KX-

Análisis estadísticos: Los datos obtenidos, fueron ordenados y separados en 5 grupos de acuerdo al grado de locomoción que presentaban los animales, y posteriormente ingresaron como variables numéricas a una planilla Microsoft Excel, en donde se calcularon promedios y desviaciones estándar para cada grupo estudiado. Los resultados se presentan en base a tablas y gráficos. De acuerdo a si los datos siguieron una distribución normal y sus varianzas eran homogéneas las diferencias entre grupos de determinaron utilizando pruebas paramétricas ANOVA de una vía o no paramétricas Kruskal-Wallis. Para determinar qué grupos eran distintos a otros se utilizó el método de Scheffé. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa estadístico SPSS 10.0.

5. RESULTADOS

5.1. CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE CORTISOL

La concentración plasmática de cortisol fue significativamente menor ($P < 0,05$) en aquellas vacas con grado de locomoción 1 con respecto a los otros grupos. Excepto por el grupo de vacas con locomoción grado 1 el resto de los grupos presentó valores por sobre el rango referencial de la especie (Figura 2).

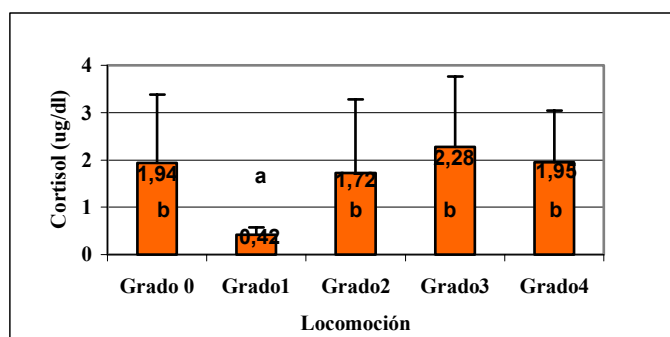


Figura 2. Valores promedio \pm D.E. de las concentraciones plasmáticas de Cortisol (ug/dl) para vacas lecheras con distintos grados de locomoción.

5.2. CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE GLUCOSA

El grupo de vacas con locomoción grado 1 presentó concentraciones plasmáticas promedio de glucosa significativamente más bajas ($P < 0,05$) con respecto a las vacas que presentaron locomoción grado 3 y 4 (Figura 3). Los valores promedio de los grupos estudiados estuvieron dentro de los rangos de referencia de la especie.

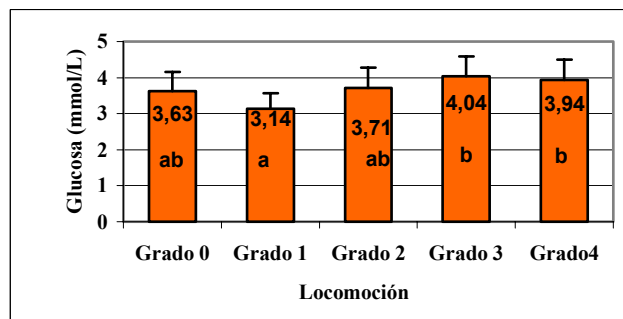


Figura 3. Valores promedio \pm D.E. de las concentraciones plasmáticas de Glucosa (mmol/L) para vacas lecheras con distintos grados de locomoción.

5.3. CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE LACTATO

No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los valores promedio de los grupos estudiados, encontrándose todos los valores dentro de los valores de referencia para la especie (Figura 4).

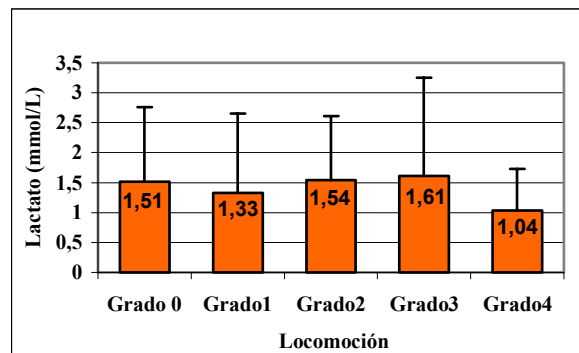


Figura 4. Valores promedio \pm D.E. de las concentraciones plasmáticas de Lactato (mmol/L) para vacas lecheras con distintos grados de locomoción.

5.4. CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE β -HIDROXIBUTIRATO (β -HBA):

Los valores plasmáticos de β -hidroxibutirato de las vacas con grado 3 de locomoción fueron significativamente más bajos ($P < 0,05$) que los valores de las vacas con grados 1 y 0 de locomoción. Los animales de los grupos con grado de locomoción 0, 1, 2 y 4 presentaron valores promedio por sobre los rangos referenciales de la especie (Figura 5).

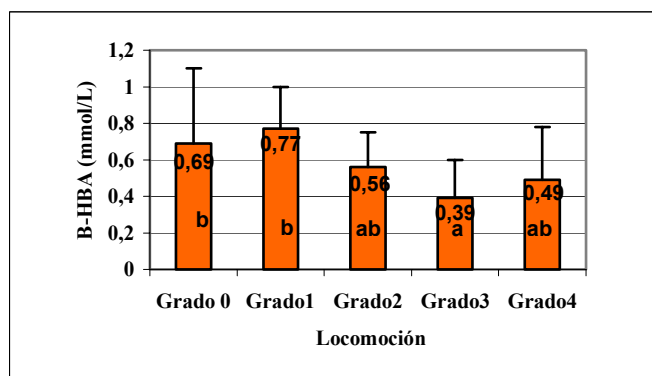


Figura 5. Valores promedio \pm D.E. de las concentraciones plasmáticas de β -Hidroxibutirato (mmol/L) para vacas lecheras con distintos grados de locomoción.

5.5. VALORES DE HEMATOCRITO

Los valores del hematocrito de las vacas con grado de locomoción 0 fueron significativamente más altos ($P < 0,05$) que los de aquellos que presentaban grado de locomoción 4, no así para los demás grados de locomoción (Figura 6). Todos los grupos presentaron valores del hematocrito dentro de los rangos de referencia para la especie.

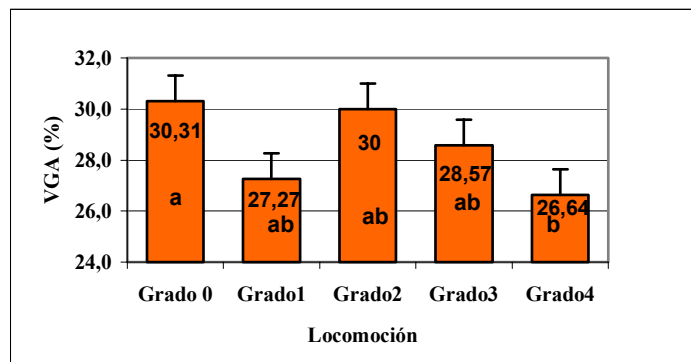


Figura 6. Valores promedio \pm D.E. de los valores sanguíneos de Hematocrito (%) para vacas lecheras con distintos grados de locomoción.

5.6. CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE CREATINFOSFOQUINASA (CK, EC 2.7.3.2.)

La actividad enzimática de creatinfosfoquinasa no presentó diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los diferentes grupos de animales estudiados. Se observó un leve aumento sobre los rangos referenciales para la especie en aquellos grupos de animales que presentaron grado 2 y 4 de locomoción, no así para los otros grupos estudiados (Figura 7).

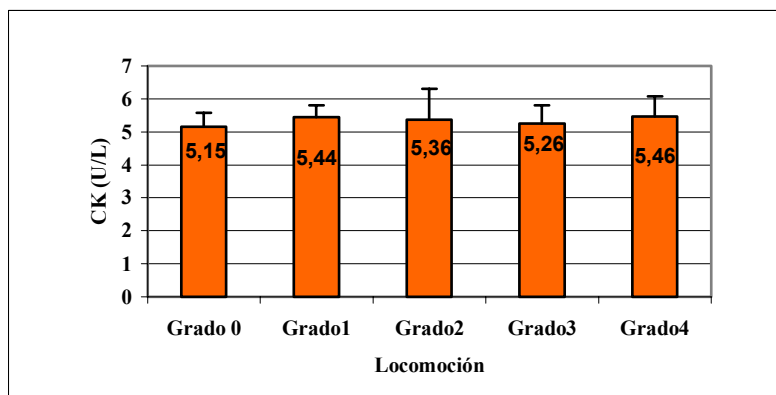


Figura 7. Valores promedio \pm D.E. de las concentraciones plasmáticas de Creatinfosfoquinasa (U/L) para vacas lecheras con distintos grados de locomoción.

5.7. CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE LEUCOCITOS

No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los valores promedio de los grupos estudiados, y todos los valores se encontraron dentro de los valores de referencia para la especie (Figura 8).

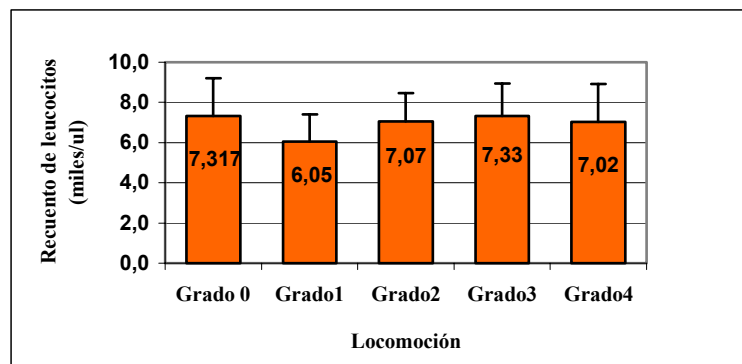


Figura 8. Valores promedio \pm D.E. de las concentraciones plasmáticas de Leucocitos (miles/ul) para vacas lecheras con distintos grados de locomoción.

6. DISCUSION

Hasta donde es conocimiento de la autora, el presente estudio es el primero realizado en Chile, que entrega antecedentes sobre la medición de variables sanguíneas con el propósito de determinar el estrés generado por las claudicaciones en vacas lecheras.

6.1. CONCENTRACIONES PLASMATICAS DE CORTISOL

Los resultados de este estudio en relación a esta variable no fueron los esperados, se postulaba que a medida que aumentara el grado de claudicación, se incrementarían las concentraciones de esta hormona (Fig. 2). Estos resultados difieren con lo encontrado por diversos autores, que demostraron un aumento en las concentraciones sanguíneas de cortisol a medida que aumentaban los niveles de estrés en los animales (Ley y col 1991, Tume y Shaw 1992). Por otro lado, las concentraciones plasmáticas de cortisol en las vacas grado 0 de locomoción fueron similares a las de las vacas con grados 2,3 y 4 de locomoción, lo que concuerda con lo reportado por Ley y col (1991) en ovejas con footrot, quienes encontraron que las concentraciones plasmáticas de cortisol en las ovejas sanas no fueron diferentes a las encontradas en las ovejas afectadas por esta condición. Sin embargo, en el presente estudio los valores de cortisol se encontraron sobre el rango de referencia para la especie en las vacas grado 0, lo que difiere con el estudio anteriormente mencionado. Este aumento podría deberse a que el cortisol es una variable fácilmente influenciada, tanto por el manejo, clima, como por los ritmos circadianos y ultradianos del cortisol presentes en vacas lecheras (Thun y col 1981, Lefcourt y col 1993).

Los animales que presentaron grados de locomoción 1, tuvieron valores significativamente menores ($P < 0,05$) que las vacas grado 0, 2, 3 y 4, lo cual pudo deberse a que la mayoría de estos animales pertenecían a un predio experimental de la Universidad Austral de Chile (Punahue), por lo que pudieron haber estado acostumbrados al manejo de rutina que se le daba en el mismo.

El aumento de los valores de las vacas con grados 2, 3 y 4 por sobre los rangos de referencia concuerda con lo encontrado por Belge y col (2004), quienes demostraron que las concentraciones plasmáticas de cortisol aumentan significativamente en vacas con laminitis crónicas.

6.2. CONCENTRACIONES PLASMATICAS DE GLUCOSA

De acuerdo con Mudron y col (2005), la glucosa sanguínea en los animales responde a algunos factores estresantes severos como es el caso del trauma quirúrgico, cursando con una

hiperglicemia, la cual solo dura un periodo corto de tiempo dependiendo principalmente de los niveles de glucocorticoides y catecolaminas circulantes. Debido a que las cojeras generalmente corresponden a cuadros de carácter crónico, no existiría un estímulo sostenido en el tiempo para que los valores de glucocorticoides y catecolaminas se mantuvieran altos durante la presentación de las cojeras y así aumentar los valores de esta variable, ya sea por un aumento en la gluconeogénesis hepática, o por una redistribución de la glucosa circulante hacia cerebro y músculo estriado, lo que no concuerda con lo encontrado en este estudio, ya que los valores de esta variable se encontraron dentro de los rangos de referencia para la especie en todos los grupos estudiados. También tenemos que tomar en cuenta que la glucosa es una variable que se ve afectada por la producción láctea, condición corporal y su estado de lactancia, siendo esta variable influenciada por factores propios del animal.

Las diferencias significativas observadas entre los grupos de animales con grado 1 y los animales grado 3 y 4 (Fig. 3), pueden deberse a que la glucosa es influenciada directamente por el cortisol y las catecolaminas, concordando en el presente estudio con el comportamiento del cortisol el cual también presentó una diferencia significativa con los grados más avanzados de locomoción (Kaneko 1997, Cunningham 1999).

6.3. CONCENTRACIONES PLASMATICAS DE LACTATO

El lactato se degrada por una disminución de las reservas energéticas provenientes directamente de la glucosa sanguínea, dependiendo directamente de los niveles de glucógeno como del nivel de oxigenación de los tejidos, ya que el lactato corresponde a un producto del metabolismo anaeróbico de los tejidos. Por lo tanto debemos tomar en cuenta que vacas que presentan cojeras prolongadas permanecen la mayor parte del tiempo echadas, lo que lleva a una destrucción del tejido muscular y a una disminución en la llegada de oxígeno, favoreciendo la conversión de piruvato a lactato (Gregory 1998). Lo planteado anteriormente no concuerda con lo encontrado en este estudio, ya que todos los grupos en relación a esta variable, se encontraron dentro de los valores de referencia para la especie, y no se observaron diferencias significativas entre los diferentes animales estudiados (Fig. 4).

La cojera como factor estresante no afectó esta variable, lo que no concuerda con lo reportado en estudios previos, donde manejos estresantes como el arreo y la manipulación de los animales en una manga, aumentan los niveles de lactato debido al incremento de los niveles de adrenalina secretada, ya que esta hormona en cuadros de estrés ayuda al metabolismo energético favoreciendo la conversión de lactato a glucosa (Mitchell y col 1988, Frandson y Spurgeon 1995, Gregory 1998, Echeverría 2002).

6.4. CONCENTRACIONES PLASMATICAS DE β -HIDROXIBUTIRATO (β -HBA)

Se observó una tendencia a disminuir los valores de β -hidroxibutirato a medida que aumentó el grado de locomoción. Se esperaba que a medida que aumentara el grado de claudicación aumentara los valores de β -hidroxibutirato producto de una disminución de la

condición corporal. Por el contrario, los valores encontrados en vacas sanas y levemente cojas fueron más altos que los con cojeras más severas (Fig. 5). Esto pudo deberse a que los animales con mayores grados de claudicación presentan una menor cantidad de depósitos grasos para poder movilizar grasas y así poder exceder la capacidad de oxidación del hígado, concordando con lo encontrado por Flor (2006), quien observó una correlación negativa entre grado de claudicación y condición corporal, es decir, a mayor grado de cojera menor cantidad de reservas grasas, debido principalmente a que los animales cojos disminuyen su consumo, ya sea por incapacidad de poder caminar y llegar al alimento, como por inhibición del centro del apetito a nivel hipotalámico.

Por lo demás, hay que tener en cuenta que animales que cursan con cuadros de claudicación presentan una disminución en la producción láctea debido a la acción de los glucocorticoides que inhiben la producción de prolactina, requiriendo menores cantidades de cuerpos cetónicos para la síntesis de la grasa de la leche (Frandsen y Spurgeon 1995).

Por otro lado Mudron y col (2005), reportaron que las concentraciones de β -hidroxibutirato disminuyeron producto del estrés generado por procedimientos quirúrgicos, debido al efecto anticetogénico de los glucocorticoides, ya que en cuadros de estrés se favorece la conversión de glucosa para la obtención de energía.

6.5. VALORES DE HEMATOCRITO (VGA)

Si bien las concentraciones del hematocrito fueron significativamente mayores en las vacas sanas con respecto a las con grado de claudicación 4, los valores de todos los grupos estuvieron dentro de los rangos de referencia para la especie (Fig. 6). Se esperaba que el hematocrito aumentara en los animales más severamente afectados, ya sea por el efecto diurético generado por los corticoesteroides inhibiendo la vasopresina a nivel del túbulo distal incrementando la velocidad de filtración glomerular (Cunningham 1999), como por la deshidratación generada debido a la falta en el consumo de agua, debido a una mayor dificultad para llegar a las fuentes de agua y de alimento. Sin embargo, en los predios visitados se observó que estos animales se encontraban aislados con fácil acceso a estas fuentes, por lo que las concentraciones del hematocrito resultaron ser más bajas en relación a los otros grados de claudicación. También hay que considerar, que las vacas sanas producen mayores cantidades de leche llevando a una mayor utilización de agua para la producción láctea, lo que podría generar un aumento del hematocrito comparado con los animales con claudicaciones más severas. Otra explicación a lo obtenido aquí, podría estar dada por el hecho de que claudicaciones severas se asocian a cuadros de inflamaciones crónicas, las que llevarían a una disminución en la hematopoyesis y disminución de los valores del hematocrito, comparados con los animales sanos (Stockham y Scott 2002).

6.6. CONCENTRACIONES PLASMATICAS DE CREATINFOSFOQUINASA (CK, EC 2.7.3.2.)

Warris y col (1995), indican que un estrés físico tal como la fatiga o la mantención de determinada postura, lleva a un desgaste físico pudiendo incrementar los niveles plasmáticos de CK. Este concepto se puede asociar a lo producido por las claudicaciones, ya que un animal con cojera cursa con incomodidad o dolor y algún grado de estrés físico llevando al animal a cambios posturales, posiciones anormales y a permanecer una mayor parte del tiempo echados generando aumento en los valores de CK (Juarez y col 2003). Si bien, las concentraciones plasmáticas de CK fueron ligeramente más altas en los animales con grados 2 y 4 de claudicación, no existieron diferencias significativas entre los diferentes grupos de animales en el estudio (Fig. 7). Este leve aumento en los animales con grados 2 y 4 por sobre los valores de animales sanos concordaría con estudios realizados en vacas cojas por Belge y col (2004), quienes encontraron que vacas con laminitis crónica presentaban valores enzimáticos levemente más altos, pero no significativos, que las vacas sanas. Sin embargo, en este estudio no se encontró relación entre el grado de cojera y los valores de CK.

6.7. RECUENTO DE LEUCOCITOS

Se ha reportado que en cuadros de estrés agudo se produce una leucocitosis generada por aumento de todos los grupos de células blancas, mientras que en cuadros de carácter crónico también ocurre un aumento en el recuento leucocitario, dado principalmente por neutrófilos y en menor cantidad por monocitos, cursando con linfopenia y eosinopenia, lo que se denomina como leucograma de estrés. (Coppo y col 1999). En el caso de las claudicaciones que corresponden en su mayoría a cuadros de estrés crónico, se produce una adaptación frente al factor estresante nocivo con lo cual los valores leucocitarios vuelven a los rangos de referencia descritos para la especie (Egaña y col 1987), por lo que no se evidenciaron diferencias significativas entre los grupos estudiados, encontrándose todos los grupos dentro de los valores de referencia para la especie (Fig. 8). Por lo tanto, en este estudio se asume que el efecto producido por las claudicaciones como factor estresante, no fue persistente para alterar los valores leucocitarios.

Conclusiones:

- Los distintos grados de claudicación no produjeron cambios significativos en los valores de los constituyentes sanguíneos utilizados en este estudio.
- También, es posible que los constituyentes sanguíneos utilizados en este estudio no sean los adecuados para evaluar el estrés producido por las cojeras en vacas lecheras.

7. – BIBLIOGRAFÍA.

- Acuña R. 2002. Estudio de rengueras en rodeos lecheros: una guía para el veterinario asesor. *X Congreso Latinoamericano de Buiatría y XXX Jornadas Uruguayas de Buiatría* Uruguay, pp 44-53.
- Alvarado M. 1999. Análisis de las concentraciones sanguíneas de algunas de las variables indicadoras de estrés por transporte, en bovinos. *Tesis de Grado*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.
- Álvarez E. 2002. Efecto de estímulos de diferente intensidad durante el arreo sobre algunas variables sanguíneas indicadoras de estrés en bovinos. *Memoria de Titulación*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.
- Axelrod J, T Reisine. 1984. Stress hormones: their interaction and regulation. *Science* 224, 452-459.
- Barielle N, P Faverdin, F Beaudeau. 2000. Effects of health disorders on feed intake and milk yield of dairy cows. *Proceedings of the 9th Symposium of the international Society of Veterinary Epidemiology and Economics*, Breckenridge. CO.
- Belge F, A Bildik, A Belge, D Kiliçalp, N Atasoy. 2004. Possible association between chronic laminitis and some biochemical parameters in dairy cattle. *Aust Vet J* 82, 556-557.
- Berry S. 1999. Hoof health. *Western dairy management conference*, Las Vegas, Nevada, Estados Unidos, pp. 13- 17.
- Breazile J. 1987. Physiologic basis and consequences of distress in animals. *JAVMA* 191, 1212-1215.
- Blood D, O Radostits, J Arundel. 1992. En: *Veterinary Medicine A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses*. Editorial Interamericana Mc-Graw Hill. 7^a ed. Madrid. España.

- Bustamante HA. 2001. Determinación del efecto de diferentes tiempos de ayuno y transporte terrestre sobre algunas variables sanguíneas indicadoras de estrés en bovinos en el período otoño-invierno. *Tesis de Licenciatura*, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile.
- Caballero S, H Sumano. 1993. Caracterización del estrés en bovinos. *Arch Med Vet* 25, 15-29.
- Carstens E, G Moberg. 2000. Recognizing pain and distress in laboratory animals. *Ila J* 41, 62-71.
- Chile 1997. Instituto Nacional de Estadísticas. IV Censo Agropecuario.
- Clarkson M, D Downham, W Faull, J Hughes, F Manson, J Merritt, R Murray, W Russell, J Sutherst, W Ward. 1996. Incidence and prevalence of lameness in dairy cattle. *Vet Rec* 138, 563-567.
- Coles E. 1986. Adrenal and pituitary function En: Pedersen D, Dick E (eds) *Veterinary Clinical Pathology*. Pp: 217-225. WB Saunders 4th ed. Philadelphia, USA.
- Contreras P. 1998. Síndrome de movilización grasa en vacas lecheras al inicio de la lactancia y sus efectos en salud y producción de los rebaños. *Arch Med Vet* 30, 17-25.
- Coppo J, N Coppo, M Revidatti, A Capellari. 2003. Modificaciones del leucograma en terneros cruzados cebú precozmente destetados. *Rev Vet* 10/11, 1 y 2, 1999-2000, 14-21.
- Cruz C, L Vargas. 1998. *Estrés, entenderlo es manejarlo*. Pp: 133. Editorial Mediterráneo. Santiago, Chile.
- Cunningham J. 1999. Sistema Endocrino. En: Cunningham J (ed). *Fisiología Veterinaria*. Pp: 409-429. Editorial Elsevier 3rd ed. Madrid, España.
- Currie W. 1988. Stress and Defense Mechanisms En: Currie W (ed). *Structure and function of domestic animals*. Pp: 315-334. Editorial Butterworth, Londres, Inglaterra.

- Echeverría RL. 2002. Efecto de dos tiempos de ayuno con y sin transporte terrestre sobre algunas variables sanguíneas indicadoras de estrés en novillos. *Memoria de Titulación*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.
- Egaña E, F Ugalde, A Valenzuela, S Bozzo. 1987. Síndrome General de Adaptación. En: Egaña E (ed). *Fisiopatología general*. Pp: 135-151. Editorial Elsevier Madrid, España
- Farm Animal Welfare Council. 1997. Report on the welfare of dairy cattle. Surrey, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food.
- Fitzgerald T, B Norton, R Elliot, H Podlich, L Svendsen. 2000. The influence of long term supplementation with biotin on the prevention of lameness in pasture fed dairy cows. *J Dairy Sci* 83,338-344.
- Flor E. 2006. Claudicaciones en vacas de rebaños lecheros de la Décima Región Chile: Prevalencia, lesiones y factores de riesgo. *Tesis Magíster*, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile.
- Frandsen R, T Spurgeon. 1995. Metabolismo y energía. En: Frandsen R, Spurgeon T (eds). *Anatomía y fisiología de los animales domésticos*. Pp. 362-370. McGraw-Hill interamericana 5th edición, México.
- Fraser A, D Broom. 1997. Describing, recording and measuring behaviour. En: Fraser A, Broom D (eds). *Farm animal behaviour and welfare*. Pp: 7-17. CABI Publishing 3rd ed. Oxon, UK.
- Friend T. 1991. Symposium: Response of animals to stress. *J Dairy Sci* 74, 292-303.
- Galindo F, D Broom, P Jackson. 2000. A note on possible link between behaviour and the occurrence of lameness in dairy cows. *Appl Anim Behav Sci* 67, 335-341.
- Green L, V Hedges, Y Schukken, R Blowey, A Packington. 2002. The impact of clinical lameness on the milk yield of dairy cows. *J Dairy Sci* 85, 2250-2256.
- Gregory N. 1998. Physiology of stress, distress, stunning and slaughter. En: Gregory N, Grandin T (eds) *Animal welfare and meat science*. Pp:35-28. CABI Publishing. Oxon, UK.

- Gomez F, H Boer, F van Eedenburg. 2003. Relationship between mild lameness and expression of oestrus in dairy cattle. *Vet Rec* 152, 403-404
- Herskin M, L Munksgaard, J Ladewig. 2004. Effects of acute stressors on nociception, adrenocortical responses and behavior of dairy cows. *Physiol Behav* 83, 411-420.
- Hettich E. 2003. Prevalencia de afecciones podales en vacas de 50 rebaños lecheros de la Décima región. *Memoria de Titulación*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.
- Juarez S, P Robinson, E DePeters, E Price. 2003. Impact of lameness on behavior and productivity of lactating Holstein cows. *Appl Anim Behav Sci* 83 (1): 14-Jan, 2003.
- Kaneko J. 1997. Carbohydrate metabolism and its diseases En: Kaneko J. (ed) *Clinical Biochemistry of Domestic Animal*. Pp. 44-86. Editorial Academic Press 4th Ed. San Diego, U.S.A.
- Lagger J, E Schmidt, D Waran, R Otrosky. 2004. Medición de cortisol en leche como indicador de bienestar animal. Resultados preliminares. *Vet Arg* 208, 577-586.
- Lay D, M Wilson. 2001. Physiological indicators of stress in domestic livestock. *Symposium on Concentrated Animal Feeding Operations Regarding Animal Behavior, Care, and Well-Being, Indiana*, pp. 1-25.
- Lefcourt A, J Bitman, S Kahl L Wood. 1993. Circadian y ultradian rhythms of peripheral cortisol concentrations in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 76, 2607-2612.
- Ley S, A Livingston, E Waterman. 1991. Effects of chronic lameness on the concentrations of cortisol, prolactin and vasopressin in the plasma of sheep. *Vet Rec* 129, 45-47.
- Ley S, A Waterman, A Livingston. 1996. Measurement of mechanical thresholds, plasma cortisol and catecholamines in control and lame cattle: a preliminary study. *Res Vet Sci* 2,172-173.
- Logue D, D Mc Nulty, A Nolan. 1998. Lameness in the dairy cow: pain and welfare. *Vet. J* 156:5-6.

- Manson F, J Leaver. 1988. The influence of concentrate amount on locomotion and clinical lameness in dairy cattle. *Anim Prod* 47, 185-190.
- Mellor D, K Stafford, S Todd, T Lowe, N Gregory, R Bruce, R Ward. 2002. Comparison of catecholamine and cortisol responses of young lambs and calves to painful husbandry procedures. *Aust Vet J* 80, 228-233.
- Meyer K, J Scaife, H Galbraith. 1998. Hoof dimensional dynamics and incidence of lameness in Holstein cows before and after turnout to pasture from concrete cubicles or straw yards. *10th Int Symp on Lameness in Ruminants*, Lucerne, Switzerland, Pp. 49–50.
- Mitchell G, J Hattingh, M Ganhao. 1988. Stress in cattle assessed after handling, after transport and after slaughter. *Vet Rec* 123, 201-205.
- Moberg G. 1987. A model for assessing the impact of behavioral stress on domestic animals. *J Anim Sci* 65: 1228-1935.
- Moberg G, J Mench. 2005. Biological response to stress: Implications for animal welfare. En: Moberg G, Mench J. *The biology of animal stress. Basic principles and implications for animal welfare*. Pp: 1-23. Editorial CABI Publishing. Cambridge, USA.
- Morrow C, E Kolver, G Verkerk, L Matthews. 2002. Fecal glucocorticoid metabolites as a measure of adrenal activity in dairy cattle. *Gen Com Endocrinol* 126, 229-241.
- Morton D, P Griffiths. 1985. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet Rec* 116, 431-436.
- Möstl E, R Palme. 2002. Hormones as indicators of stress. *Domest Anim Endocrinol* 23, 67-74.
- Mudron P, J Rehage, H Sallmann, M Höltershinken, H Scholz. 2005. Stress response in dairy cows related to blood glucose. *Acta Vet BRNO* 74, 37-42.

- Muir W, A Wiese, T Wittum. 2004. Prevalence and characteristics of pain in dogs and cats examined as outpatients at a veterinary teaching hospital. *JAVMA* 224, 1459-1463.
- Münzenmayer W. 1997. Afecciones podales en rodeos lecheros: desafío profesional. *Therios* (suppl. esp.), 1-31.
- O'Callaghan K. 2002. Lameness and associated pain in cattle – challenging traditional perceptions. *In practice* 24, 212-219.
- Oyarce J, N Tadich, C Gallo. 2002. Determinación de algunos constituyentes sanguíneos indicadores de estrés, en novillos en reposo. Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Producción Animal. 2-4 octubre. Chillán, Chile.
- Palme R, C Robia, W Baumgartner, E Möstl. 2000. Transport stress in cattle as reflected by an increase in faecal cortisol metabolite concentrations. *Vet Rec* 146, 108-109.
- Radostits O, C Gay, D Blood, K Hinchcliff. 2000. General systems states. En: Radostits O, Gay C, Blood D, Hinchcliff K. *Veterinary Medicine; A textbook of the disease of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. Pp: 41-112. W.B. Saunders Company. 9th edición. London, England.
- Rehbun W, C Payne, J King, M Wolfe, S Begg. 1980. Interdigital papillomatosis in dairy cattle. *JAVMA* 177, 437-440.
- Scott P. 1996. Lameness in dairy cattle. *Br Vet J* 152, 11-12.
- Sprecher D, D Hostetler, J Kaneene. 1997. A lameness scoring system that uses posture and gait to predict dairy cattle reproductive performance. *Theriogenology* 47, 1179-1167.
- Stockham S, M Scott. 2002. Erythrocytes. En: Stockham S, Scott M (eds). *Fundamentals of veterinary clinical pathology*. Pp: 85-154. Editorial Iowa State Press, Iowa, USA.
- Stott G. 1981. What is animal stress and how is it measured? *J Anim Sci* 52, 150-153.

- Tadich N, C Gallo, M Alvarado. 2000. Efectos de 36 horas de transporte terrestre con y sin descanso sobre algunas variables sanguíneas indicadoras de estrés en bovinos. *Arch. Med. Vet.* 32, 171-183.
- Tadich N, C Gallo, R Echeverría, G Schaik. 2003. Efecto del ayuno durante dos tiempos de confinamiento y de transporte terrestre sobre algunas variables sanguíneas indicadoras de estrés en novillos. *Arch Med Vet* 35, 171-185.
- Tadich N. 2004. Claudicaciones en la vaca lechera y su relación con el bienestar. *Resúmenes seminario producción animal de calidad contemplando bienestar animal*, Valdivia, pp. 32-39.
- Tadich N, E Hettich, G van Schaik. 2005. Prevalencia de cojeras en vacas de 50 rebaños lecheros del sur de Chile. *Arch Med Vet* 37, 29-36.
- Tejeda C. 2006. Asociación entre grado de claudicación, umbrales nociceptivos, valores de haptoglobina y variables fisiológicas en vacas cojas de lechería. *Memoria de Título*, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile.
- Tume R, F Shaw. 1992. Beta-endorphin and cortisol concentrations in plasma of blood samples collected during exsanguination of cattle. *Meat Sci* 31, 211-217.
- Thun R, E Eggenberger, K Zerobin, T Lüscher, W Vetter. 1981. Twenty-four-hour secretory pattern of cortisol in the bull: evidence of episodic secretion and circadian rhythm. *Endocrinol* 109, 2208-2212.
- Vermunt J. 1992. Subclinical laminitis in dairy cattle. *NZ Vet J* 40: 133-138.
- Vermunt J. 1999. Regular claw trimming for the control of lameness: good or bad. *Vet J* 157, 109-110.
- Vermunt J. 2005. The multifactorial nature of cattle lameness: a few more pieces of the jigsaw. *Vet J* 169, 317-318.

- Warris P, S Brown, T Knowles, S Kestin, J Edwards, S Dolan, A Phillips. 1995. Effects on cattle of transport by road for up to 15 hours. *Vet Rec* 136, 319-323.
- Whay H, A Waterman, A Webster, J O'Brien. 1998. The influence of lesion type on the duration of hyperalgesia associated with hindlimb lameness in dairy cattle. *Vet J* 156, 23-29.
- Webster A. 2001. Farm animal welfare: the five freedoms and the free market. *Vet J* 161, 229-237.
- Wells S, S Ott, A Hillberg. 1998. Key health issues for dairy cattle – new and old. *J Dairy Sci* 81, 3029-3035.
- Wittwer F, H Böhmwald. 1983. Manual de Patología Clínica Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile.
- Yagi Y, H Shiono, Y Chikayama, A Ohnuma, Y Nakamura, K Yayou. 2004. Transport stress increases somatics cell counts in milk, and enhances the migration capacity of peripheral blood neutrophils of dairy cows. *J Vet Med Sci* 66, 381-387.
- Zimmerman A. 2001. Lameness in dairy cattle: are activity levels, hoof lesions and lameness correlated? *Tesis de Grado*, Faculty of Land and Food Systems, University of British Columbia.

8. ANEXOS

Anexo 1. Valores individuales de Cortisol, Glucosa, Lactato, β -Hidroxibutirato, VGA, CK y Leucocitos de los animales con grado de locomoción 0.

| n° autocrotal | Cortisol (ug/dl) | Hematocrito (%) | Leucocitos (miles/ μ l) | Glucosa (mmol/L) | Lactato (mmol/L) | CK (U/L) | CK (LN) (U/L) | BHB (mmol/L) |
|---------------|------------------|-----------------|-----------------------------|------------------|------------------|----------|---------------|--------------|
| 34 | 0,41 | 30 | 7,2 | 3,98 | 3,13 | 455 | 6,12029742 | 0,65 |
| 140 | 4,46 | 32 | 7,2 | 3,55 | 2,89 | 193 | 5,26269019 | 0,44 |
| 220 | 0,81 | 26 | 7,2 | 3,98 | 0,82 | 137 | 4,91998093 | 0,74 |
| 247 | 3,3 | 31 | 7,6 | 3,72 | 2,79 | 183 | 5,20948615 | 0,48 |
| 310 | 3,95 | 29 | 7,6 | 3,63 | 1,32 | 148 | 4,99721227 | 0,92 |
| 451 | 1,89 | 28 | 7,2 | 3,67 | 0,97 | 232 | 5,44673737 | 0,71 |
| 475 | 1,55 | 31 | 4,4 | 3,81 | 1,92 | 160 | 5,07517382 | 0,69 |
| 633 | 3,57 | 26 | 5,2 | 3,62 | 1,51 | 150 | 5,01063529 | 0,71 |
| 638 | 0,78 | 32 | 6,4 | 3,05 | 0,32 | 199 | 5,29330482 | 0,7 |
| 972 | 0,3 | 28 | 9,6 | 2,32 | 0,35 | 156 | 5,04985601 | 2,49 |
| 1010 | 0,3 | 30 | 7,2 | 3 | 0,4 | 125 | 4,82831374 | 0,71 |
| 1034 | 4,04 | 33 | 9,2 | 3,87 | 1,18 | 106 | 4,66343909 | 0,69 |
| 1065 | 2,94 | 28 | 6 | 3,95 | 1,33 | 130 | 4,86753445 | 0,53 |
| 1130 | 1,1 | 31 | 8 | 4,17 | 3,33 | 210 | 5,34710753 | 0,54 |
| 1136 | 2,24 | 27 | 4,4 | 4,07 | 4,94 | 92 | 4,52178858 | 0,45 |
| 1141 | 0,32 | 30 | 5,2 | 3,42 | 0,35 | 163 | 5,0937502 | 0,51 |
| 1154 | 0,3 | 29 | 6 | 3,21 | 0,67 | 215 | 5,37063803 | 0,96 |
| 1172 | 0,3 | 30 | 6 | 3,17 | 0,33 | 314 | 5,74939299 | 0,44 |
| 1173 | 0,48 | 26 | 6,4 | 3,26 | 0,38 | 168 | 5,12396398 | 0,53 |
| 1198 | 0,3 | 29 | 6,4 | 3,09 | 0,23 | 131 | 4,87519732 | 1,4 |
| 1296 | 1,09 | 31 | 14,4 | 3,26 | 0,56 | 43 | 3,76120012 | 0,56 |
| 1358 | 0,3 | 28 | 7,6 | 2,13 | 0,4 | 115 | 4,74493213 | 1,7 |
| 1417 | 1,54 | 33 | 7,6 | 4,04 | 1,3 | 196 | 5,27811466 | 0,35 |
| 1566 | 3,85 | 33 | 6,4 | 4,36 | 0,77 | 199 | 5,29330482 | 0,59 |
| 1801 | 3,37 | 26 | 6,4 | 4,21 | 1,74 | 129 | 4,8598124 | 0,43 |
| 1900 | 2,52 | 30 | 8 | 4,1 | 3,77 | 140 | 4,94164242 | 0,47 |
| 2092 | 1,34 | 38 | 8,4 | 4,01 | 4,72 | 321 | 5,77144112 | 0,71 |
| 2111 | 2,49 | 33 | 8,5 | 3,14 | 0,82 | 275 | 5,6167711 | 0,53 |
| 2127 | 0,3 | 28 | 8 | 3,44 | 0,53 | 264 | 5,5759491 | 0,51 |
| 2202 | 4,73 | 24 | 7,6 | 4,15 | 1,33 | 157 | 5,05624581 | 0,54 |
| 2140 | 2,95 | 39 | 8,8 | 3,57 | 1,58 | 171 | 5,14166356 | 0,5 |
| 3079 | 0,84 | 35 | 6 | 3,66 | 1,4 | 292 | 5,6767538 | 0,71 |
| 4720 | 4,09 | 38 | 6 | 4,24 | 1,56 | 222 | 5,40267738 | 0,27 |
| 5009 | 2,15 | 31 | 6,4 | 4,04 | 2,66 | 106 | 4,66343909 | 0,56 |
| 5095 | 2,92 | 28 | 11,6 | 4,09 | 0,71 | 95 | 4,55387689 | 0,53 |

Anexo 2. Valores individuales de Cortisol, Glucosa, Lactato, β -Hidroxibutirato, VGA, CK y Leucocitos de los animales con grado de locomoción 1.

| N° autocrotal | Cortisol (ug/dl) | Hematocrito (%) | Leucocitos (miles/ μ l) | Glucosa (mmol/L) | Lactato (mmol/L) | CK (U/L) | CK (LN) (U/L) | BHB (mmol/L) |
|---------------|------------------|-----------------|-----------------------------|------------------|------------------|----------|---------------|--------------|
| 397 | 0,38 | 23 | 3,2 | 3,3 | 0,41 | H | H | 0,59 |
| 514 | 0,41 | 30 | 4,8 | 3,21 | 0,85 | 283 | 5,6454469 | 0,95 |
| 573 | 0,43 | 31 | 6,4 | 3,46 | 0,52 | 153 | 5,03043792 | 0,7 |
| 845 | 0,73 | 24 | 4,4 | 3,08 | 0,43 | 188 | 5,23644196 | 0,53 |
| 893 | 0,3 | 24 | 8 | 3,75 | 2,75 | 204 | 5,31811999 | 0,63 |
| 1053 | 0,49 | 22 | 8 | 3,07 | 0,31 | 478 | 6,16961073 | 0,48 |
| 1207 | 0,45 | 24 | 4,8 | 3,13 | 0,7 | 141 | 4,94875989 | 0,62 |
| 1272 | 0,48 | 27 | 5,2 | 1,89 | 2,6 | H | H | 0,71 |
| 1312 | 0,3 | 29 | 6,8 | 2,91 | 0,48 | 344 | 5,84064166 | 1,3 |
| 1414 | 0,3 | 31 | 5,2 | 3,63 | 1,3 | 180 | 5,19295685 | 0,91 |
| 1509 | 0,3 | 26 | 7,2 | 3,07 | 0,39 | 227 | 5,42495002 | 1,19 |
| 1535 | 0,3 | 24 | 6,4 | 2,63 | 0,63 | 147 | 4,99043259 | 0,77 |
| 2015 | 0,3 | 31 | 7,2 | 3,34 | 0,79 | 351 | 5,86078622 | 0,58 |
| 2157 | 0,3 | 36 | 6,8 | 3,48 | 2,7 | 307 | 5,72684775 | 0,77 |
| 2335 | 0,78 | 27 | 6,4 | 3,13 | 5,11 | 212 | 5,35658627 | 0,86 |

Anexo 3. Valores individuales de Cortisol, Glucosa, Lactato, β -Hidroxibutirato, VGA, CK y Leucocitos de los animales con grado de locomoción 2.

| N° autocrotal | Cortisol (ug/dl) | Hematocrito (%) | Leucocitos (miles/ μ l) | Glucosa (mmol/L) | Lactato (mmol/L) | CK (U/L) | CK (LN) (U/L) | BHB (mmol/L) |
|---------------|------------------|-----------------|-----------------------------|------------------|------------------|----------|---------------|--------------|
| 441 | 1,34 | 30 | 8,4 | 3,08 | 0,5 | 252 | 5,52942909 | 0,33 |
| 536 | 0,3 | 25 | 7,6 | 3,9 | 0,52 | 928 | 6,83303173 | 0,76 |
| 747 | 1,18 | 30 | 6,4 | 3,55 | 0,68 | 161 | 5,08140436 | 0,47 |
| 986 | 1,34 | 29 | 7,6 | 4,03 | 1,73 | 155 | 5,04342512 | 0,81 |
| 1021 | 1,87 | 33 | 6,4 | 3,7 | 0,95 | 24 | 3,17805383 | 0,7 |
| 1053 | 1,48 | 28 | 6 | 3,39 | 2,45 | 362 | 5,89164421 | 0,76 |
| 1111 | 6,39 | 23 | 6,8 | 5,59 | 4,48 | 167 | 5,11799381 | 0,14 |
| 1120 | 2,17 | 27 | 7,6 | 3,76 | 0,45 | 201 | 5,30330491 | 0,64 |
| 1188 | 2,88 | 29 | 5,2 | 3,94 | 2,41 | 88 | 4,47733681 | 0,48 |
| 1191 | 0,34 | 28 | 6,8 | 3,84 | 0,42 | 202 | 5,3082677 | 0,71 |
| 1244 | 0,3 | 38 | 7,6 | 3,75 | 0,59 | 833 | 6,72503364 | 0,68 |
| 1483 | 2,24 | 31 | 7,2 | 3,37 | 1,45 | 807 | 6,69332367 | 0,49 |
| 1522 | 0,3 | 28 | 4 | 2,3 | 0,31 | 234 | 5,45532112 | 0,83 |
| 1849 | 1,65 | 33 | 9,2 | 3,69 | 1,31 | 428 | 6,0591232 | 0,52 |
| 2071 | 4,91 | 29 | 5,6 | 3,73 | 2,36 | 33 | 3,49650756 | 0,29 |
| 2033 | 0,3 | 36 | 9,2 | 3,5 | 0,75 | 151 | 5,01727984 | 0,47 |
| 2117 | 1,92 | 30 | 6,8 | 3,57 | 2,67 | 164 | 5,09986643 | 0,58 |
| 2306 | 0,77 | 34 | 6,8 | 3,35 | 3,15 | 189 | 5,24174702 | 0,59 |
| 3098 | 0,37 | 33 | 5,2 | 3,78 | 1,58 | 798 | 6,6821086 | 0,35 |
| 5023 | 3,38 | 25 | 9,6 | 3,99 | 1,53 | 312 | 5,74300319 | 0,35 |
| 5064 | 0,79 | 31 | 8,4 | 4,05 | 2,13 | 104 | 4,6443909 | 0,78 |

Anexo 4. Valores individuales de Cortisol, Glucosa, Lactato, β -Hidroxibutirato, VGA, CK y Leucocitos de los animales con grado de locomoción 3.

| N° autocrotal | Cortisol (ug/dl) | Hematocrito (%) | Leucocitos (miles/ μ l) | Glucosa (mmol/L) | Lactato (mmol/L) | CK (U/L) | CK (LN) (U/L) | BHB (mmol/L) |
|---------------|------------------|-----------------|-----------------------------|------------------|------------------|----------|---------------|--------------|
| 51 | 5,57 | 33 | 10,4 | 4,01 | 1,21 | 153 | 5,03043792 | 0,26 |
| 125 | 1,32 | 33 | 5,2 | 3,65 | 0,77 | 253 | 5,53338949 | 0,29 |
| 626 | 3,92 | 23 | 5,6 | 3,42 | 1,11 | 156 | 5,04985601 | 0,29 |
| 740 | 1,85 | 34 | 6 | 3,88 | 0,83 | 260 | 5,56068163 | 0,41 |
| 1078 | 4,01 | 29 | 8,4 | 4,19 | 2,26 | 157 | 5,05624581 | 0,23 |
| 1366 | 4,73 | 33 | 10,8 | 4,69 | 5,38 | 158 | 5,06259503 | 0,79 |
| 1244 | 0,3 | 28 | 9,2 | 3,48 | 0,53 | 261 | 5,56452041 | 0,46 |
| 1471 | 1,42 | 12 | 5,6 | 5,76 | 1,38 | 346 | 5,84643878 | 0,85 |
| 1485 | 0,3 | 32 | 6,4 | 3,42 | 0,6 | 206 | 5,32787617 | 0,86 |
| 1549 | 1,22 | 33 | 6,4 | 3,89 | 0,72 | 299 | 5,70044357 | 0,33 |
| 1560 | 2,22 | 29 | 5,6 | 3,59 | 3,81 | 245 | 5,50125821 | 0,56 |
| 1792 | 1,44 | 29 | 7,2 | 3,85 | 0,48 | 117 | 4,76217393 | 0,48 |
| 1804 | 2,5 | 28 | 6 | 3,92 | 1,19 | 325 | 5,78382518 | 0,29 |
| 1852 | 1,9 | 27 | 6,4 | 3,8 | 0,49 | 166 | 5,11198779 | 0,49 |
| 1861 | 2 | 24 | 6,8 | 4,55 | 0,48 | 382 | 5,94542061 | 0,21 |
| 2053 | 4,38 | 26 | 8 | 4,73 | 1,82 | 166 | 5,11198779 | 0,24 |
| 2075 | 0,81 | 27 | 9,2 | 3,53 | 0,59 | 32 | 3,4657359 | 0,33 |
| 2136 | 3,69 | 28 | 7,2 | 3,75 | 0,83 | 338 | 5,8230459 | 0,21 |
| 2167 | 0,97 | 29 | 9,2 | 4,29 | 0,44 | 121 | 4,79579055 | 0,05 |
| 2251 | 2,24 | 28 | 6,4 | 4,18 | 2,44 | 283 | 5,6454469 | 0,31 |
| 5114 | 1,05 | 35 | 8 | 4,31 | 6,57 | 113 | 4,72738782 | 0,3 |

Anexo 5. Valores individuales de Cortisol, Glucosa, Lactato, β -Hidroxibutirato, VGA, CK y Leucocitos de los animales con grado de locomoción 4.

| N° animal | Cortisol (ug/dl) | Hematocrito (%) | Leucocitos (miles/ μ l) | Glucosa (mmol/L) | Lactato (mmol/L) | CK (U/L) | CK (LN) (U/L) | BHB (mmol/L) |
|-----------|------------------|-----------------|-----------------------------|------------------|------------------|----------|---------------|--------------|
| 265 | 0,62 | 21 | 8 | 3,86 | 0,48 | 137 | 4,91998093 | 0,38 |
| 605 | 0,94 | 24 | 9,2 | 3,46 | 0,77 | 202 | 5,3082677 | 1,32 |
| 873 | 0,54 | 33 | 3,2 | 2,71 | 0,46 | 125 | 4,82831374 | 0,28 |
| 1241 | 2,58 | 29 | 4,8 | 3,5 | 0,5 | 230 | 5,43807931 | 0,74 |
| 1288 | 3,35 | 26 | 8,4 | 3,93 | 0,5 | 187 | 5,23110862 | 0,25 |
| 1785 | 1,64 | 28 | 8 | 4,25 | 1,39 | 1020 | 6,92755791 | 0,35 |
| 1805 | 1,53 | 23 | 6 | 4,62 | 0,71 | 273 | 5,6094718 | 0,33 |
| 2123 | 3,98 | 26 | 7,2 | 4,44 | 2,52 | 119 | 4,77912349 | 0,41 |
| 2160 | 2,67 | 27 | 10 | 4,72 | 1,35 | 150 | 5,01063529 | 0,36 |
| 2388 | 2,5 | 28 | 6,4 | 4,1 | 0,57 | 369 | 5,91079664 | 0,42 |
| 7255 | 1,05 | 28 | 6 | 3,72 | 2,13 | 456 | 6,12249281 | 0,5 |

Anexo 6. Valores promedios y Desviaciones Estándar de Cortisol (ug/dl) para los animales con distintos grados de locomoción.

| Cortisol | Grado 0 | Grado1 | Grado2 | Grado3 | Grado4 |
|-----------------|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Promedio | 1,94 | 0,42 | 1,72 | 2,28 | 1,95 |
| DV | 1,44 | 0,15 | 1,56 | 1,48 | 1,09 |

Anexo 7. Valores promedios y Desviaciones Estándar de Glucosa (mmol/L) para los animales con distintos grados de locomoción.

| Glucosa | Grado 0 | Grado1 | Grado2 | Grado3 | Grado4 |
|----------------|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Promedio | 3,63 | 3,14 | 3,71 | 4,04 | 3,94 |
| DV: | 0,52 | 0,43 | 0,57 | 0,54 | 0,56 |

Anexo 8. Valores promedios y Desviaciones Estándar de Lactato (mmol/L) para los animales con distinto grado de locomoción.

| Lactato | Grado 0 | Grado1 | Grado2 | Grado3 | Grado4 |
|----------------|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Promedio: | 1,51 | 1,33 | 1,54 | 1,61 | 1,04 |
| DV: | 1,25 | 1,32 | 1,07 | 1,64 | 0,69 |

Anexo 9. Valores promedio y Desviaciones Estándar de β -Hidroxibutirato (mmol/L) para los animales con distintos grados de locomoción.

| β-Hidroxibutirato | Grado 0 | Grado1 | Grado2 | Grado3 | Grado4 |
|---|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Promedio | 0,69 | 0,77 | 0,56 | 0,39 | 0,49 |
| DV | 0,41 | 0,23 | 0,19 | 0,21 | 0,29 |

Anexo 10. Valores promedio y Desviaciones Estándar de Hematocrito (%) para los animales con distintos grados de locomoción.

| Hematocrito | Grado 0 | Grado1 | Grado2 | Grado3 | Grado4 |
|--------------------|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Promedio | 30,31 | 27,27 | 30 | 28,57 | 26,64 |
| DV | 3,45 | 3,82 | 3,57 | 4,89 | 3,08 |

Anexo 11. Valores promedio y Desviaciones Estándar de Creatinfosfoquinasa (U/L) para los animales con distintos grados de locomoción.

| Creatinfosfoquinasa | Grado 0 | Grado1 | Grado2 | Grado3 | Grado4 |
|----------------------------|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Promedio: | 5,15 | 5,44 | 5,36 | 5,26 | 5,46 |
| DV: | 0,42 | 0,37 | 0,94 | 0,55 | 0,62 |

Anexo 12. Valores promedio y Desviaciones Estándar de Leucocitos (miles/ μ l) para los animales con distintos grados de locomoción.

| Leucocitos | Grado 0 | Grado1 | Grado2 | Grado3 | Grado4 |
|-------------------|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Promedio: | 7,32 | 6,05 | 7,07 | 7,33 | 7,02 |
| DV: | 1,88 | 1,35 | 1,40 | 1,62 | 1,89 |

9. AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a todas las personas que hicieron posible la realización de este Trabajo.

De manera muy especial a:

Dr. Néstor Tadich por su orientación, apoyo y más que nada, paciencia.

A la Sra. Helga Bömwald, Efrén Flor y a los docentes que colaboraron en la culminación de este trabajo.

A todos los trabajadores de las lecherías por su colaboración.

A los que me acompañaron y ayudaron en mis años de estudio Margarita Cerón, Daniel, Gerardo, Saúl, etc.

Y muy en especial a mis queridos amigos: Claudia Tejada, Carolina Castillo, Claudia Tapia, Jorgue Aguirre, Margarita Mateluna, Francisco Velásquez, Yorka Reyes, Alejandro Barrientos y Delia Araus para todos ellos de todo corazón gracias por ser y estar.