



201
2ej

**CONCENTRACION DE ACIDO VANILMANDELICO
EN ORINA DE VACAS HOLSTEIN
CLINICAMENTE SANAS.**

Tesis presentada para la obtención
del título de
Médico Veterinario Zootecnista
ante la División de Estudios Profesionales
de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la
Universidad Nacional Autónoma de México
por

HECTOR MORALES ORTEGA

Asesores: M.V.Z. Héctor Sumano López
M.V.Z. Luis Ocampo Camberos
M.V.Z. Sara Caballero Chacón

México, D. F.
1991



FALLA LA ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

	<u>Página.</u>
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
MATERIAL Y METODOS.....	7
RESULTADOS.....	11
DISCUSION.....	12
LITERATURA CITADA.....	14
FIGURAS.....	19
CUADROS.....	22

RESUMEN

MORALES ORTEGA HECTOR. Concentración de ácido vanilmandélico en orina de vacas holstein clínicamente sanas (bajo la dirección de: Hector Sumano López, Luis Ocampo Camberos y Sara Caballero Chacón).

Con la intención de encontrar parámetros confiables para definir objetivamente si existe o no estrés en los bovinos y considerando que el dato no se ha informado en la literatura, se consideró de utilidad determinar la proporción de ácido vanilmandélico-creatinina (AVM-Cr) en la orina de vacas holstein bajo condiciones normales de manejo. Los valores de AVM-Cr fluctuaron entre 3.14 mg y 67.9 mg; con un valor medio de 11.02959 y una desviación estandar \pm 11.19047. No se detectaron correlaciones significativas por partos, edad o capacidad productiva. Se postula que estos datos pueden tomarse como basales de la cantidad de AVM-Cr en vacas holstein no sujetas a estrés.

I N T R O D U C C I O N

El estrés se define como: "El conjunto de reacciones (biológicas y psicológicas) que se desencadenan en un organismo cuando se enfrenta de una forma brusca con un agente nocivo, cualquiera que sea su naturaleza" (23). En biología se utiliza comunmente el término estrés para indicar una respuesta inespecífica del organismo a cualquier demanda externa; en la que los animales se encuentran sujetos a condiciones ambientales adversas e interfieren con su bienestar (30). Los agentes inductores de estrés alteran la reacción generalizada y desequilibran los mecanismos reguladores homeocinéticos. Al alterarse estos mecanismos, el organismo pierde la capacidad de mantener sus oscilaciones fisiológicas dentro de los límites normales y es cuando surge el denominado síndrome general de adaptación (22,29). Este comprende tres fases, que son : La reacción de alarma, que esta dada por la respuesta inmediata del sistema nervioso simpático ante una estimulación aguda. Cuando hay una estimulación de tipo crónico hay participación del eje hipotálamo-hipófisis y corteza adrenal, cuyas implicaciones, en ambos casos pueden llevar al organismo a un estado de adaptación y resistencia. La reacción de agotamiento es la última fase del síndrome, en la que la respuesta

del individuo ante un estímulo crónico rebasa los niveles de resistencia y trae como consecuencia el agotamiento de la energía de adaptación y finalmente la muerte (22,28) (vease figura 1).

Mucho se ha especulado acerca del grado de estrés al que están sujetos los animales (4,7); en ellos se consideran diferentes tipos de estrés y estos son: el estrés de producción, el estrés calórico, el estrés nutricional y el estrés emocional; todos ellos calificados la mayoría de las veces, con base en criterios de rendimiento y en ocasiones de conducta (3,15,18,30,35).

Hasta ahora la mayor parte de los estudios encaminados a cuantificar el nivel de estrés, se han hecho en función de un criterio etológico, muy a menudo antropocéntrico y de objetividad relativa (5,7,20).

En la actualidad, la única forma que pudiera calificarse de realmente objetiva para determinar el grado de estrés de los animales es con base en los valores plasmáticos y urinarios de cortisol y de sus metabolitos (1,16,26), además de las mediciones de cortisol libre en saliva (9,24).

El cortisol y la corticosterona capacitan a los animales para tolerar condiciones de estrés, produciendo ajustes fisiológicos y metabólicos para mantener la homeocinesis (29).

En los bovinos (17,29) se ha reportado un incremento en

las concentraciones de corticosteroides sanguíneos, en varias situaciones de estrés (alteraciones del ambiente, temperatura, manejo y alimentación); pero se sabe que las concentraciones de corticosteroides basales varían notablemente (14,20,34).

La cuantificación de las variaciones hormonales pueden dar la pauta para medir el fenómeno de estrés (2,13,14,25).

En humanos se ha postulado que una de las formas más confiables de determinar el grado de estrés, es mediante la determinación de los niveles urinarios del metabolito de las catecolaminas (epinefrina y norepinefrina); el ácido vanilmandélico (AVM) (12,31).

Las catecolaminas tienen una vida media de alrededor de 2 minutos en la circulación. En su mayor parte son metiladas y luego oxidadas hasta ácido 3-metoxi-4 hidroximandélico (ácido vanilmandélico, AVM), (figura 2). Cerca del 50 % de las catecolaminas secretadas aparecen en la orina como metanefrinas libres o conjugadas y 35 % como AVM. Sólo se excretan por vía urinaria pequeñas cantidades de noradrenalina y adrenalina libres. En las personas normales, cerca de 30 μ g de noradrenalina, 8 μ g de adrenalina, y 700 μ g de AVM son excretados por día (12).

Durante el estrés calórico agudo y crónico las catecolaminas circulantes presentan niveles sanguíneos altos en bovinos

(15), sin embargo, en la literatura que normalmente se maneja en medicina veterinaria (6,8,19), no existen datos suficientes sobre las concentraciones normales de AVM urinario en bovinos. Savio et al (27), midieron los niveles de AVM en vacas expuestas a estrés de tipo agudo (moscas) bajo condiciones de temperatura controladas, obteniendo un incremento sobre los valores medios de AVM urinario asociado al estrés. El promedio fue de 13.3 ± 3.1 $\mu\text{g}/100$ ml en el periodo de control y de 18.9 ± 3.4 $\mu\text{g}/100$ ml durante la exposición a la mosca. Dado que las catecolaminas son las mismas en el hombre y en los bovinos y que su metabolito es igual (10,12,21,33), es factible usar la determinación de AVM en animales de la misma manera que en humanos; esto es, como medida de estrés.

En función de que la concentración del AVM puede revelar el grado de estrés al que se sujetan los animales y por la importancia de abatir esta influencia para la producción ética y óptima de alimentos de origen animal, se consideró de utilidad llevar a cabo un ensayo en el que se determinarán los valores de AVM en orina de vacas Holstein clínicamente sanas, como parametro fisiológico basal.

HIPOTESIS

Existen niveles detectables y constantes de ácido vanilmandélico en la orina de vacas Holstein.

OBJETIVO

Establecer los valores normales de ácido vanilmandélico en la orina de vacas Holstein.

MATERIAL Y METODOS

Este ensayo se llevo a cabo en la " Granja El escudo " ubicada en el kilometro 30 de la carretera México - Cuautla, en Ixtapaluca Edo.de México, situada en el altiplano a 2250 metros sobre el nivel del mar, con una temperatura media anual de 15.3 °C , con una precipitación pluvial de 665.9 mm anual y con vientos dominantes de Sur a Norte.

Se utilizaron 98 vacas Holstein Friesian de 2 a 11 años de edad, clinicamente sanas. A cada vaca se le tomo 1 muestra de orina, (a 49 de ellas durante la ordeña de la mañana y las otras 49 en la ordeña de la tarde) en forma directa.

Cada muestra fué de 100 ml. se colectaron en frascos ambar y limpios, y se les conservó con ácido clorhídico 6N al 10 % y en congelación a 4°C para su transporte a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia en el departamento de Fisiología y Farmacología donde se les analizo mediante la técnica de Pisano *et al.* (31) que a continuación se describe.

- 1.- Se verifica el pH de la orina (siempre menor de tres).
- 2.- En un tubo poner 1 ml de acido clorhídico concentrado.
- 3.- Añadir 10 ml de orina lentamente.
- 4.- Agregar 0.75 g de silicato de magnesio.
- 5.- Agitar suavemente durante 10 minutos (cada minuto por 10 segundos).

5.- Centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos y filtrar con papel Watherman de número 1 .

Extraccion.

- 1.- A 3 tubos con tapon esmerilado de 50 ml marcarlos con :
Blanco, estandar y problema.
- 2.- Agregar al tubo blanco 2 ml de agua destilada.
- 3.- Agregar al tubo estandar 2 ml de solución diluida de acido vanilmandelico (10 %).
- 4.- Agregar en los tubos problema 2 ml de la orina diclorada.
- 5.- A todos los tubos añadir 20 ml de acetato de etilo y agitar 30 segundos.
- 6.- Centrifugar 3 minutos a 1500 rpm y aspirar la parte inferior.
- 7.- Añadir 2.5 ml de carbonato de sodio al 2.44 % agitar 30 segundos, centrifugar 3 minutos a 1500 rpm y aspirar la capa superior.
- 8.- Pasar 2 ml de la capa inferior a todos los tubos de centrifuga de 15 ml con tapón esmerilado.

Reaccion de color.

- 1.- Añadir 0.1 ml de reactivo de diazo (1 ml de solución de nitrito de sodio al 5% y 8 ml de solución de para-nitro-anilina al 2%), mezclar suavemente y dejar reposar durante 5 minutos.
- 2.- Agregar 6 ml de acetato de etilo a todos los tubos, agitar

durante 20 segundos, centrifugar a 1500 rpm por un minuto y aspirar la capa inferior.

- 3.- Añadir 1 ml de solución de hidróxido sodico al 10.7%, agitar 20 segundos, centrifugar 1 minuto a 1500 rpm y aspirar la capa inferior.
- 4.- Repetir el paso anterior 2 veces, si es necesario hasta que la capa inferior sea incolora.
- 5.- Añadir 2 ml de metanol a todos los tubos y mezclar suavemente.
- 6.- Dejarlos reposar durante 5 minutos y leer con el colorimetro a 530 nm absorbancia.

También se determinaron los valores de creatinina en las muestras de orina. Dado que la tasa de excreción de la creatinina es relativamente constante de día a día, el gasto de creatinina se mide a veces como una comprobación de la exactitud de los estudios metabólicos en las recolecciones de orina. Si se calcula el promedio diario de excreción de creatinina, es posible corregir los valores para la excreción diaria de otras sustancias. (12)

A cada uno de los datos obtenidos en la lectura del colorimetro a 530 nm de absorbancia; se les dividió con el resultado de las muestras estándar, el dato que se obtuvo se multiplicó por los mililitros de la muestra (1000 ml) a este resultado se le multiplicó por una constante (0.011),

obteniéndose así los mg AVM por 1000 ml de orina. este resultado se relacionó efectuando una división con los gramos de creatinina obtenidos en este mismo ensayo, dandonos como resultado los mg de AVM por g de creatinina. (Cuadro 1A, 1B). Estos mg AVM/g creatinina fueron sometidos a un análisis de correlación de Pearson, para las variables edad, producción y número de partos (Cuadro 2A, 2B), con el fin de determinar la posible influencia de estas variables, en el grado de estrés de los animales.

RESULTADOS

La medición de los niveles de AVM en la orina de las 98 vacas en producción (vease cuadro 1A y 1B), mostró los siguientes resultados:

Los valores de ácido vanilmandélico por gramo de creatinina obtenidos en este ensayo tuvieron un promedio de 11.029 mg de AVM/g de creatinina, con una desviación estandar de 11.191 . Los valores máximos y mínimos se encontraron dentro de un rango de 3.14 - 67.9 mg de AVM/g de creatinina (vease cuadro 3). El análisis de correlación realizado mediante la prueba de coeficientes de correlación de Pearson indica que parece no existir una correlación entre los valores de ácido vanilmandélico-creatinina y los parámetros de producción láctea, numero de partos y edad del animal. Los resultados de este ensayo se resumen en el cuadro 4.

En todos los ensayos que se realizaron para la determinación del AVM, se analizo conjuntamente una muestra control en cuyos resultados hubo una diferencia entre el valor más bajo y el más alto de 1.0 mg.

D I S C U S I O N

Los niveles de ácido vanilmandélico-creatinina parecen no presentar una correlación con la producción láctea, la edad del animal y el número de partos. Esto resulta ser un hallazgo positivo, ya que los valores obtenidos en este ensayo pueden servir como parámetros basales iniciales de ácido vanilmandélico-creatinina para medir el estrés, sin que las variables anteriores interfieran como factores adicionales de estrés. Dado que al parecer este es el primer ensayo en el que se estudian los niveles de ácido vanilmandélico-creatinina en vacas lecheras, es factible considerarlos como una línea inicial para cuantificar el estrés e incluso se puede pensar que estos pudieran ser incluidos en algunas bibliografías con relación al laboratorio clínico, que aportan información sobre los parámetros plasmáticos normales en los animales. Además los resultados obtenidos en este estudio se pueden complementar con otros parámetros cualitativos y/o cuantitativos usados para medir el estrés, tales como los niveles de cortisol, parámetros productivos e incluso estudios etológicos.

Una utilidad más de este ensayo se puede poner de manifiesto si se toma en cuenta que existen factores externos capaces de modificar el grado de estrés de los bovinos a los que estos no

están adaptados ; así, las concentraciones de AVH urinario se podrían encontrar elevadas como una respuesta a un incremento de la secreción de catecolaminas circulantes.

Una situación similar ocurre en humanos (2,7) en las que bajo situaciones de ansiedad o estrés agudo los niveles urinarios de AVH se encuentran aumentados.

Se ha visto en diversos estudios (11), que los niveles de cortisol se incrementan en los bovinos que están sujetos a diversos factores inductores de estrés. Sin embargo, se sabe que la técnica para medir cortisol (RIA) aunque sensible resulta ser cara y poco práctica, por lo que se puede pensar en las mediciones de AVH que ofrecen una alternativa más para medir el nivel de estrés o bien servir como complemento en los estudios determinados a medirlo.

L I T E R A T U R A C I T A D A

1. - Arave, C.W.; Mickelsen, C. H.; Lamb, R.C.; Svejda, A. J. and Canfield, R.V.: Effects of dominance rank changes, age and body weight on plasma corticoids of mature dairy cattle. J. Dairy Sci., 60: 244 (1977).
2. - Axerold, J. and Reisine, T.D. : Stress hormones: Their interaction and regulation. Science 224:452-459 (1984).
3. - Beede, D.K.; Mallone, P.G.; Collier, R.J. and Wilcox, C.J.: Milk yield, feed intake, and physiological responses of dairy cows to varying dietary potassium during heat stress. J. Anim. Sci., 53 (suppl. 1): 381 (Abstr.) (1981).
4. - Broom, D.M.: Indicators of poor welfare. Br. Vet. J., 142: 524-556 (1986).
5. - Broom, D.M.: The stress concept and ways of assessing the effects of stress in farm animals. Appl. Anim. Ethol., 11: 79 (1983).
6. - Coles, E.H.: Veterinary Clinical pathology. 4a. ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1986.
7. - Dantzer, R. and Mormede, P.: Stress in farm animals: a need for reevaluation. J. Anim. Sci., 57: 6-18 (1983).
8. - Doxey, D.L.: Patología Clínica y procedimientos de Diagnostico en Veterinaria. 2a. ed. El Manual Moderno.

México, (1983).

9. - Fell, L.R.; Shutt, D.A. and Bentley, C.J.: Development of a salivary cortisol method for detecting changes in plasma "free" cortisol arising from acute stress in sheep. Aust. Vet. J., 62: 403-407 (1988).
10. - Frandson, R.D.: Anatomía y fisiología de los animales domésticos. 3a. ed. Interamericana, México, 1984.
11. - Friend, T.H.; Polan, C.E.; Gwazdauskas, F.C. and Heald, C.W.: Adrenal glucocorticoid response to exogenous adrenocorticotropin mediated by density and social disruption in lacting cows. J. Dairy Sci., 60: 1958-1963 (1977).
12. - Ganong, W.F.: Fisiología Médica. 9a. ed. El Manual Moderno, México, 1984.
13. - Gwazdauskas, F.C.: Interrelationships of certain thermal and endocrine phenomena and reproductive function in the female bovine. Ph. D. Dissertation, Univ. of Florida Gainesville, 1974.
14. - Hudson, S., Mullord, W.G.; Whittlestone, W.G. and Payne, E.: Diurnal variations in blood cortisol in the dairy cow. J. Dairy Sci., 58: 30-33 (1975).
15. - Jhonson, H.D. and Vanjonak, W.J.: Effects of environmental and other stressors on blood hormone patterns in lactating

- animals. J. Dairy Sci. 69 (1986).
15. - Lader, S.A.; Wolth, J.E.; Ejac, P.K. and Carsia, K.V.: Effects of stress from electrical of horning on feed intake, growth, and blood constituents of Holstein heifer calves. J. Dairy Sci. 68: 3062-3066 (1985).
17. - Lee, J.A.; Roussel, J.D. and Beatty, J.F.: Effect of temperature-season on bovine adrenal cortical function, blood cell profil, and milk production. J. Dairy Sci. 59: 104-108 (1976).
18. - Lough, D. S.; Beede, D.L. and Wilcox, C.J.: Effects of feed intake and thermal stress on mammary blood flow and other physiological measurements in lacting dairy cows. J. Dairy Sci. 73: 325-332 (1990).
19. - Maxine, M.B.: Manual de Patologia Clinica en Veterinaria. Limusa, México, 1984.
20. - Hoberg, G.P.: A model for assessing the impact of behavioral stress on domestic animals. J. Anim. Sci. 65: 1226-1235 (1987).
21. - Murray, R.K.; Granner, D.K.; Mayes, P.A. and Rodwell, V.M.: Bioquímica de Harper. 11a. ed. El Manual Moderno, México, 1988.
22. - Navarro, H.J.: Stress: Su efecto sobre canales del ganado de abasto. Sep. 1986. (Sin publicar).

- 23.- Navarro Beltrán I.E.: Diccionario terminológico de ciencias médicas. 12 ed. Salvat. Barcelona (España), 1984.
- 24.- Parrot, R.F. and Misson, B.H.: Changes pigs salivary cortisol in response to transport stimulation, food y water deprivation, and mixing. Br. Vet. J., 145: 501-505 (1989).
- 25.- Raud, H.R.; Kiddy, C.A. and Odell, W.O.: The effect of stress upon the determination of the serum prolactin by radioimmunoassay. Pro. Soc. Exp. Biol. Med., 130: 689-693 (1971).
- 26.- Rhynes, W.E. and Ewing, L.L.: Plasma corticosteroids in Hereford bulls exposed to high ambient temperature. J. Anim. Sci., 36: 369 (1973).
- 27.- Savid, T.J.; Johnson, H.D.; Hahan, L. and Thomas, G.D.: Effect of horn flies on vanilmandelic acid excretion of dairy cattle. J. Dairy Sci., 59: 318-320 (1976).
- 28.- Selye, H.: The evaluation of the stress concept. Am. Sci. 26: 901 (1973).
- 29.- Smith, R.D.; Hansel, W. and Coppock, C.E.: Plasma adrenocorticoid response to corticotropin in dairy cattle fed high silage diets. J. Dairy Sci., 58: 1708-1712 (1975).
- 30.- Stott, G.H.: What in animal stress and how is it measured. J. Anim. Sci., 52: 150-153 (1981).

31. - Tietz, N.W.: Fundamentals of Clinical Chemistry. Nueva Editorial Interamericana, México, 1970.
32. - Wayne, W.D.: Biostatística. 3a. ed. Limusa, México, 1988.
33. - Wilson, J.A.: Fundamentos de fisiología animal. Limusa, México, 1989.
34. - Willet, L.B. and Erb, R. E.: Short term changes in plasma corticoids in dairy cattle. J. Anim. Sci., 34: 103-107 (1972).
35. - Wise, M.E.; Armstrong, J.T.; Hunter, R. and Wiersma, F.: Hormonal alterations in the lacting dairy cow in response to thermal stress. J. Dairy Sci., 71: 2480-2485 (1988).

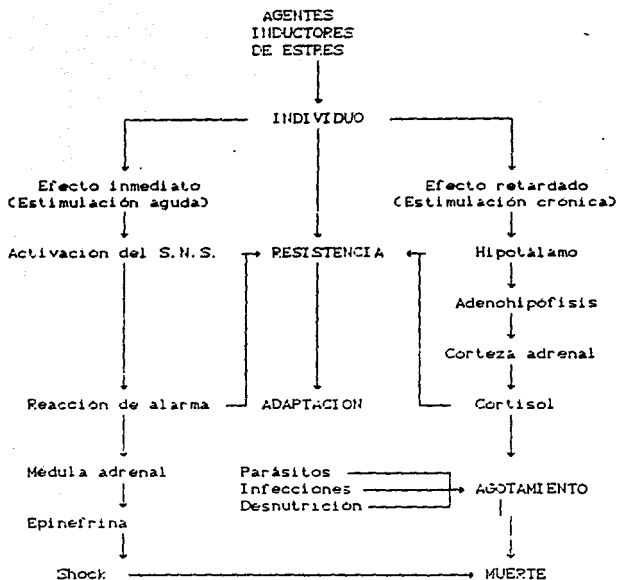


Figura 1. Esquema del " Síndrome General de Adaptación ".

Modificado de Selye (28).

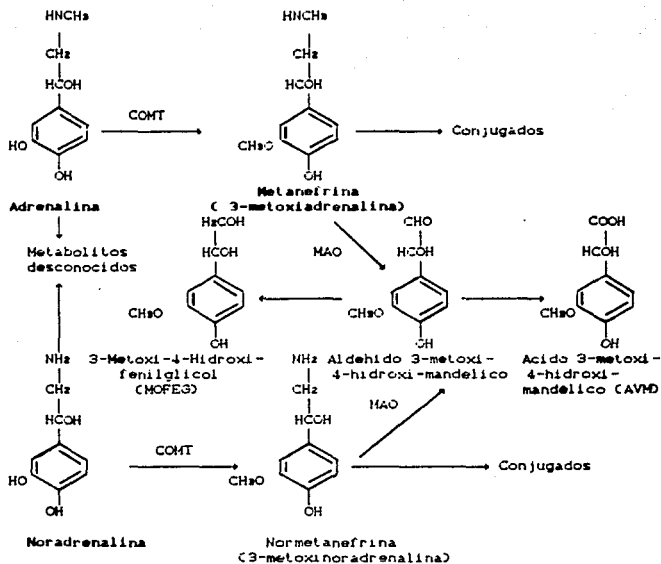


FIGURA 2.A.: Catabolismo de la adrenalina y de la noradrenalina. El sitio principal del catabolismo es el hígado. Los conjugados son principalmente glucuronidos y sulfatos. MOFEG también es conjugado. (12)

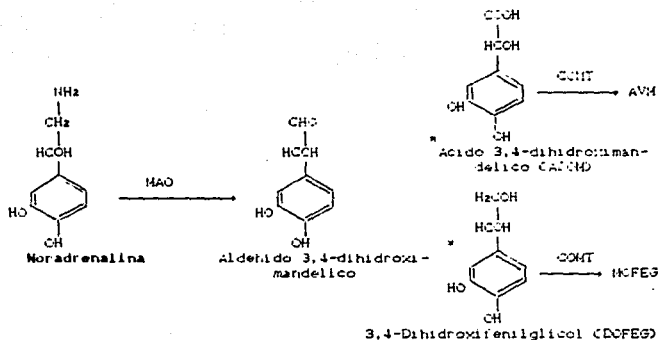


FIGURA 2.8.: Catabolismo de la noradrenalina en las terminaciones nerviosas adrenergicas. El ácido y el glicol entran a la circulación, y subsecuentemente pueden ser transformados, por O-metilación, en AVM y MOFEG. La adrenalina en las terminaciones nerviosas quizá sea catabolizada en igual forma. MAO, monoaminooxidasa; COMT, catecol-O-metiltransferasa. (12)

Cuadro IA.- Operaciones aritméticas realizadas para obtener los μ g de AVM/g de creatinina.

No. DE VACA	no. ASESOR- BANCIA	STANDARD	MUESTRA (ml)	CONSTANTE	AVM (ng/1000 ml)	CREATININA (g)	μ g. AVM POR g DE CREATININA
		S	X	1000 X	X	0,011	X
15	0,050	0,253	1000	0,011	3,76	0,31	12,14
80	0,113	0,263	1000	0,011	4,62	0,59	7,83
169	0,094	0,279	1000	0,011	3,71	0,48	7,72
194	0,081	0,269	1000	0,011	3,31	0,59	5,61
216	0,081	0,269	1000	0,011	3,31	0,72	4,60
230	0,098	0,245	1000	0,011	4,40	0,10	44,00
232	0,096	0,245	1000	0,011	4,31	0,11	39,18
238	0,105	0,245	1000	0,011	4,71	0,82	5,75
241	0,110	0,246	1000	0,011	5,37	0,56	9,58
255	0,081	0,248	1000	0,011	3,59	0,81	4,44
267	0,103	0,245	1000	0,011	4,62	0,76	6,02
280	0,093	0,279	1000	0,011	3,67	0,10	36,67
284	0,094	0,279	1000	0,011	3,71	0,76	4,88
363	0,100	0,274	1000	0,011	4,01	0,88	4,56
394	0,075	0,269	1000	0,011	3,07	0,66	4,65
409	0,096	0,246	1000	0,011	4,29	0,62	6,92
430	0,070	0,274	1000	0,011	2,81	0,11	25,55
441	0,077	0,263	1000	0,011	3,22	0,70	4,60
443	0,090	0,279	1000	0,011	3,55	0,61	5,82
508	0,115	0,245	1000	0,011	4,71	0,33	12,09
517	0,131	0,263	1000	0,011	3,61	0,10	36,06
523	0,131	0,279	1000	0,011	3,59	0,72	4,98
528	0,050	0,245	1000	0,011	3,55	0,81	4,38
614	0,061	0,279	1000	0,011	3,59	0,54	6,64
626	0,070	0,279	1000	0,011	2,76	0,39	7,08
641	0,096	0,263	1000	0,011	4,02	0,54	7,44
701	0,083	0,248	1000	0,011	3,68	0,68	5,41
705	0,026	0,245	1000	0,011	3,65	0,96	4,02
714	0,089	0,263	1000	0,011	3,72	0,35	10,64
716	0,094	0,269	1000	0,011	3,84	0,10	39,44
752	0,025	0,263	1000	0,011	3,56	0,89	3,99
755	0,087	0,269	1000	0,011	3,56	0,10	35,58
801	0,083	0,245	1000	0,011	3,73	0,83	4,49
855	0,092	0,269	1000	0,011	3,76	0,55	6,84
860	0,053	0,246	1000	0,011	3,06	0,63	4,86
875	0,072	0,274	1000	0,011	2,89	0,54	5,35
879	0,062	0,274	1000	0,011	3,73	0,43	8,68
912	0,093	0,263	1000	0,011	3,89	0,28	13,33
925	0,072	0,274	1000	0,011	2,85	0,32	3,14
956	0,025	0,269	1000	0,011	3,49	0,37	9,34
985	0,068	0,245	1000	0,011	3,05	0,76	4,02
1011	0,064	0,248	1000	0,011	2,84	0,56	5,07
1014	0,024	0,248	1000	0,011	3,73	0,65	5,73
1091	0,081	0,263	1000	0,011	3,21	0,83	4,09
1147	0,024	0,253	1000	0,011	3,51	0,71	4,95
1151	0,065	0,274	1000	0,011	3,41	0,37	3,52
1194	0,069	0,248	1000	0,011	3,05	0,40	7,65
1.43	0,102	0,246	1000	0,011	4,56	0,54	7,12
1247	0,021	0,247	1000	0,011	3,61	0,55	6,55

Cuadro 18.- Operaciones aritméticas realizadas para obtener los mg de AYN/g de creatinina.

No. DE YACA	no. ABSOR- BANCIA	STANDARD	MUESTRA (µl)	CONSTANTE	AYN µg/1000 µl	CREATININA (µg)	mg AYN POR g DE CREATININA
		X	Y	X 1000	X 0.011	Y	Y
16	0,104	0,245	1000	0,011	4,67	0,56	8,34
29	0,088	0,193	1000	0,011	4,90	0,74	6,62
30	0,102	0,243	1000	0,011	4,62	0,21	21,99
45	0,061	0,211	1000	0,011	3,18	0,76	4,18
69	0,089	0,193	1000	0,011	5,07	0,58	8,60
102	0,100	0,245	1000	0,011	4,49	0,6	7,48
171	0,065	0,193	1000	0,011	3,70	0,29	12,77
232	0,069	0,245	1000	0,011	5,10	0,36	8,61
243	0,092	0,245	1000	0,011	4,13	0,27	4,75
244	0,093	0,253	1000	0,011	4,04	0,11	36,76
267	0,102	0,239	1000	0,011	4,69	0,68	6,90
285	0,068	0,245	1000	0,011	3,05	0,11	27,76
321	0,132	0,253	1000	0,011	5,74	0,16	35,87
335	0,101	0,243	1000	0,011	4,57	0,58	7,88
342	0,080	0,193	1000	0,011	4,56	0,99	4,61
349	0,077	0,193	1000	0,011	4,59	0,48	9,14
363	0,098	0,246	1000	0,011	4,38	0,53	8,27
371	0,067	0,193	1000	0,011	3,82	0,59	6,58
385	0,078	0,211	1000	0,011	4,07	0,7	5,21
419	0,087	0,193	1000	0,011	4,96	0,78	6,36
435	0,063	0,211	1000	0,011	3,23	0,49	6,70
443	0,072	0,152	1000	0,011	5,21	0,56	7,29
490	0,098	0,246	1000	0,011	3,93	0,6	6,56
552	0,101	0,243	1000	0,011	4,57	0,6	7,62
577	0,113	0,243	1000	0,011	5,12	0,78	6,56
600	0,079	0,245	1000	0,011	3,55	0,54	6,57
716	0,078	0,245	1000	0,011	3,50	0,34	10,30
717	0,150	0,243	1000	0,011	6,79	0,1	67,90
745	0,101	0,253	1000	0,011	4,29	0,13	32,78
751	0,089	0,253	1000	0,011	3,53	0,43	8,90
755	0,092	0,246	1000	0,011	4,38	0,82	5,34
797	0,103	0,193	1000	0,011	5,87	0,92	6,29
799	0,097	0,239	1000	0,011	4,46	0,58	7,70
829	0,082	0,243	1000	0,011	3,71	0,39	9,52
840	0,088	0,152	1000	0,011	6,37	0,46	13,84
849	0,082	0,193	1000	0,011	4,67	0,32	14,60
872	0,100	0,253	1000	0,011	4,25	0,65	6,69
910	0,091	0,239	1000	0,011	4,19	0,55	7,62
938	0,079	0,253	1000	0,011	3,29	0,3	11,30
972	0,069	0,152	1000	0,011	4,29	0,64	7,80
1064	0,103	0,193	1000	0,011	5,87	0,75	7,83
1102	0,092	0,246	1000	0,011	4,11	0,4	10,28
1106	0,112	0,253	1000	0,011	4,87	0,44	11,07
1116	0,041	0,152	1000	0,011	2,97	0,37	8,02
1160	0,091	0,253	1000	0,011	3,96	0,59	6,71
1200	0,088	0,245	1000	0,011	3,65	0,99	4,03
1203	0,078	0,246	1000	0,011	3,43	0,55	6,34
1257	0,059	0,211	1000	0,011	3,02	0,64	4,72
1291	0,089	0,239	1000	0,011	4,10	0,92	4,45

CUADRO 2A

Variables consideradas para este ensayo como factores adicionales de estrés (número de partos, edad de la vaca y producción láctea).

NÚM. DE VACA	mg. AVH POR g DE CREATININA	NÚM. DE PARTOS	EDAD (AÑOS)	PRODUCCION (LITROS) (DIARIOS)
15	12,14	1	3	21,0
80	7,83	3	6	25,0
169	7,72	1	3	25,0
194	5,61	1	2	25,0
218	4,60	1	2	25,0
230	44,00	4	5	33,0
232	39,18	1	3	10,0
238	5,75	6	6	23,0
241	9,58	4	5	32,0
255	4,44	2	3	21,0
267	6,08	2	5	36,0
280	36,67	2	4	27,0
284	4,98	3	7	35,0
383	4,56	1	3	15,0
394	4,65	2	3	29,0
409	6,92	2	3	42,0
430	25,55	5	7	8,0
441	4,60	5	8	8,0
443	5,82	1	3	14,0
508	12,09	2	3	10,0
517	38,06	1	3	18,0
523	4,98	1	3	13,0
538	4,38	3	5	26,0
614	6,64	1	2	16,0
626	7,06	1	3	24,0
641	7,44	7	10	18,0
701	5,41	2	3	37,0
705	4,02	5	7	43,0
714	10,64	1	3	27,0
716	38,44	4	5	39,0
752	3,99	2	4	12,0
755	35,58	3	5	25,5
801	4,49	3	6	32,0
855	6,84	1	3	31,0
860	4,86	1	3	24,0
875	5,35	1	3	24,0
879	8,66	2	4	31,0
912	13,89	1	3	30,0
925	3,14	3	6	22,0
956	9,39	2	3	33,0
985	4,02	1	3	12,0
1011	5,07	2	4	15,0
1014	5,73	1	2	33,0
1091	4,09	2	4	21,0
1147	4,95	3	5	4,0
1151	3,52	7	11	21,0
1194	7,65	2	4	19,0
1243	7,13	2	4	33,0
1247	6,56	2	3	30,5

- 25 -
CUADRO 2B

Variables consideradas para este ensayo como factores adicionales de estrés (número de partos, edad de la vaca y producción láctea).

NO DE VACA	mg. AVH POR g DE CREATININA	NUM. DE PARTOS	EDAD (AÑOS)	PRODUCCIÓN (LITROS) (LÍTRICOS)
16	8,34	3	6	21,8
29	6,62	2	4	24,0
38	21,93	4	9	25,0
45	4,18	4	7	25,0
69	8,60	3	5	25,0
102	7,48	3	7	15,0
171	12,77	3	8	30,0
232	8,61	1	3	10,0
243	4,75	3	6	10,0
244	36,76	5	6	4,0
267	8,90	3	5	36,0
285	17,76	3	5	16,0
321	35,67	4	7	14,0
335	7,88	1	4	12,5
342	4,61	2	4	35,0
349	9,14	1	4	21,0
363	9,27	2	3	13,0
371	6,58	2	3	24,0
385	5,81	2	4	15,0
419	6,36	1	3	26,0
435	6,70	2	4	13,0
443	7,39	1	3	14,0
490	6,55	3	5	14,0
552	7,62	1	3	20,0
577	6,56	2	5	5,0
600	6,57	4	7	14,0
716	10,30	4	5	19,0
717	67,90	4	5	36,0
745	33,78	1	2	29,0
751	6,90	6	8	16,0
755	5,34	3	5	26,5
797	6,38	2	3	33,0
799	7,70	2	4	28,0
829	9,52	1	3	5,0
840	13,64	2	4	32,0
849	14,60	2	4	32,0
872	6,63	4	5	32,0
910	7,62	3	6	13,0
938	11,30	4	6	22,0
972	7,80	2	4	25,0
1064	7,83	2	4	29,0
1102	10,28	3	2	10,0
1106	11,07	3	4	17,0
1116	8,02	1	3	20,0
1160	6,71	2	3	26,0
1200	4,03	1	2	39,5
1203	6,34	2	4	18,0
1257	4,72	2	4	13,0
1291	4,36	7	9	23,5

CUADRO # 3

ANALISIS DE CORRELACION

4 VARIABLES: mg AVM/g de creatinina, número de partos, edad y producción.

Estadística Simple

Variable	Muestras	Media	Dev. Estándar	Sumatoria
mg AVM/g creatinina	98	11.02959	11.19047	1081
Número de partos	98	2.51020	1.45194	246
Edad	98	4.26531	1.75800	418
Producción	98	22.88776	8.95652	2243

ANALISIS DE CORRELACION

Estadística Simple

Variable	Minima	Máxima
mg AVM/g creatinina	3.14000	67.90000
Núm. de partos	1.00000	7.00000
Edad	2.00000	11.00000
Producción	4.00000	43.00000

CUADRO # 4

ANALISIS DE CORRELACION

Coefficientes de correlación de Pearson $\sqrt{\text{Prob}} > R$; bajo H_0 :
Rho=0 /Muestras=98

	Acido vanilmandélico (AVM)	Numero de partos	Edad	Producción
Acido vanil- mandélico CAVM	1.00000 0.0	0.13882 0.1728	0.136629 0.1809	0.05213 0.6102
Numero de partos	0.13882 0.1728	1.00000 0.0	0.60545 0.0001	0.03558 1.7279
Edad	0.13629 0.1809	0.60545 0.0001	1.00000 0.0	-0.07970 0.4354
Producción	0.05213 0.6102	-0.03558 0.7279	-0.07970 0.4354	1.00000 0.0