



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y

ZOOTECNIA

RELACIÓN DEL ESTRÉS FISIOLÓGICO CON EL ESTRÉS  
OXIDATIVO GANADO LECHERO GESTANTE EN PASTOREO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

PRESENTA

**ANDREA MARTÍNEZ GARCÍA**

Asesores

Dr. Antonio Díaz Cruz

Dra. Marcela del Rosario González de la Vara

México, D.F

2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

## DEDICATORIA

A la energía más hermosa y poderosa del universo, Dios, por darme la oportunidad de realizar paso a paso mi "Leyenda Personal". Gracias por lo que me ha sucedido y sucederá desde que concebiste mi existencia hasta que decidas que se esfume el último de mis alientos, sé que nada habrá sucedido por casualidad y que todo habrá valido la pena.

A mi mamá, Josefina García M, por ser uno de los pilares fundamentales en mi vida; muchas gracias por tu amor, sensibilidad, tiempo, cuidados y apoyo incondicional. Eres una guerrera inteligente, incansable y llena de espiritualidad de la cual, me siento profundamente orgullosa. Te amo.

A mi papá, Roberto Martínez C, porque eres el otro cimiento en el que descansa mi existencia, gracias por mostrarme el mundo, por ayudarme a forjar mi carácter y hacer crecer el arraigo a la familia y a nuestras tradiciones. Ten por seguro que siempre agradeceré ser tu hija. Te amo.

A mi hermana por ser mi cómplice, mi ejemplo, mi apoyo y mi persona favorita. Gracias por quererme tanto pues sin tu insistencia yo no estaría aquí. Te amo.

A mis abuelos por el legado recibido, por ser la base de la familia, pero sobre todo por el amor que han sembrado en mí. Gracias por hacer de mi infancia una de las etapas más hermosas de mi vida.

A mis sobrinos por ser ese pedacito de cielo que Dios puso en mi camino; muchas gracias por las risas y la inocencia que vive en todos ustedes, deseo que cumplan sus sueños siempre.

A todos mis tíos y primos por alentarme a seguir adelante y apoyarme en diversos momentos importantes en mi vida. Cada uno de ustedes ha influido enormemente en el concepto que tengo de la existencia.....gracias.

A Don Jorge (q.p.d.) por su cariño, confianza y amistad, la cual me acompañará siempre, no importando el tiempo ni el espacio.

A los animales, sobre todo a las vacas, por ser mi inspiración y darme la oportunidad de entrar en su mundo. Mil gracias por todas las satisfacciones que me dan.

*"El amor es el gran motor de nuestra vida. Es lo que nos purifica, nos impulsa a ser mejores, a luchar no sólo por nuestros sueños sino por los sueños universales. Puede ser el amor al prójimo, a nuestro trabajo, a nuestra familia, o una gran pasión personal, pero recordemos que sin amor, nuestra búsqueda no es nada"*  
Paulo Coelho

## AGRADECIMIENTOS

A los propietarios y al personal de los Ranchos: “Ojo de Rana”, “Las Milpillas”, “San Martín”, “El Jarrero”, “El Espino Alto”, “El Espino Bajo” y “El Guayabo” por las facilidades otorgadas para la realización del presente trabajo. Muchas gracias por su confianza y colaboración.

Al Dr. José Luis Ruiz Colina y a la Enf. María del Carmen Arroyo Luna por permitirme trabajar en las instalaciones de la clínica, pero sobre todo por su ayuda y los conocimientos que me regalaron.

Al todo el personal del Subcomité de Bovinos Leche, Michoacán, por el apoyo recibido, en especial al MVZ. Luis David Aguilar Romero: gracias por el tiempo, la ayuda y el aprendizaje.

A la Dra. Marta Romano Pardo por las facilidades otorgadas para llevar a cabo la presente investigación.

Al Dr. Antonio Díaz Cruz por su confianza, apoyo incondicional y por preocuparse por mi presente y mi futuro.

A la Dra. Marcela de Rosario González de la Vara por su apoyo, afecto, confianza y amistad. Gracias por sus consejos, por todos los maravillosos momentos que compartimos y espero, sigamos compartiendo por mucho tiempo más. Gracias por abrirme las puertas de su casa y permitirme conocer un lugar tan mágico como San José, ha sido una experiencia inolvidable.

A la familia González de la Vara por su hospitalidad y confianza, en especial a tía Evelia por enseñarme que en la vida siempre debemos ser valientes.

Al Dr. Cuauhtémoc Nava por su ayuda, tiempo, consejos, experiencia y amistad. Fue un placer trabajar con usted.

Al personal del laboratorio No. 34 del Posgrado de la Facultad de Medicina de la UNAM, por su ayuda y confianza. Gracias por permitirme conocerlos y formar parte de su equipo. Su profesionalismo y entrega es impresionante.

A mi jurado: MVZ Javier de Jesús Valencia, MVZ Arturo Federico Olguín, MVZ Sergio Carlos Ángeles, MVZ Anne María del Pilar Sisto por sus comentarios y recomendaciones.

A todas las personas que conforman la Dirección General de Servicios Médicos de la UNAM por la evolución profesional y personal que me otorgaron, en especial al Lic. Cuauhtémoc Solís Torres y al Dr. Francisco Javier Straffon por la confianza depositada en mí y por todos sus consejos.

A quienes colaboran en el Departamento de Salud Ambiental de la DGSM por compartir conmigo hermosos instantes, en particular a los MVZ Juan Mancilla Castillo y Fidel Ramírez Ruiz por su amistad y apoyo incondicional, por llorar y reír junto conmigo en los momentos más difíciles de los últimos tiempos. Gracias por nunca abandonarme!!!!

Al MVZ, Ms Salvador Avila Téllez y a su esposa por guiarme en el maravilloso mundo del conocimiento y la vida, mil gracias por su paciencia y afecto.

Al Dr. Abner Josué Gutiérrez Chávez por sus consejos y enseñanzas, el cuidado, la complicidad, el apoyo y la amistad recibida a lo largo de todo este tiempo. Gracias por ser uno de mis mejores ejemplos.

Al personal del Departamento de Producción Animal: Rumiantes que compartió conmigo momentos inolvidables, gracias por cuidarme cuando lo necesité y hacer que me sintiera en confianza.

A mis amigos por ser mis cómplices, mis confidentes y parte fundamental en mi existencia. Gracias a todos por escucharme, cuidarme, reír, llorar, disfrutar y sufrir conmigo. En especial a Jana, Moni, Lidia, Adriana, Sandra, Akemi, Rocío, Selene, Paulina, Yaz, Carmina, Silvia, Liz, Claudia, María, José Guadalupe, Roberto, Vladimir, Daniel por el tiempo, la esperanza, y fé otorgadas. Los quiero muuucho!

A la Psic. Ximena Luna por ayudarme a reencontrarme y reinventarme. Gracias por tu tiempo y apoyo; sin ti, esto no hubiera sido posible.

A Rodrigo de Alba Flores por escucharme y darme una opinión objetiva; por compartir con la familia buenos y malos momentos pero sobre todo, por hacer tan feliz a uno de los seres más importantes en mi vida.

Al Act. Alfredo Souza Uribe por refrendar en mí que “la belleza de una mujer no está en la moda superficial; la verdadera belleza de una mujer se refleja en su alma, en la bondad con la que da amor y en la pasión que demuestra”. Gracias por todo.

A mis profesores y compañeros de generación por darme la oportunidad de conocerlos y disfrutar juntos la maravillosa experiencia que implica formar parte de la FMVZ, UNAM. Gracias por todas sus enseñanzas.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser la mejor universidad de América Latina, por permitirme ser parte de sus filas, por el orgullo de portar su camiseta y por todas y cada una de las oportunidades concedidas a lo largo de estos años.

## CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
3. RESULTADOS.....	28
4. DISCUSIÓN.....	31
5. CONCLUSIONES.....	36
6. REFERENCIAS.....	37

## RESUMEN

MARTÍNEZ GARCÍA ANDREA. Relación del estrés fisiológico con el estrés oxidativo en vacas gestantes en pastoreo (bajo la dirección de: Dr. Antonio Díaz Cruz y Dra. Marcela del Rosario González De la Vara).

El objetivo de esta investigación fue determinar el estrés oxidativo en vacas Holstein en pastoreo mediante las pruebas de FRAP, TBARS y actividad de la GSH-Px y buscar su posible relación con el estrés fisiológico medido por las concentraciones de cortisol en suero. Se empleó el suero de 10 vacas con 6 meses de gestación (Grupo 1) y 10 con 2 días antes del parto (Grupo 2). Los datos fueron comparados mediante la prueba T de Student y la correlación del estrés fisiológico con el oxidativo se determinó empleando la prueba de Pearson ( $P < 0.05$ ). Se encontró que la capacidad antioxidante (FRAP) del grupo 1 fue mayor que la del grupo 2 ( $G1 = 522.944 \pm 40.792$  Vs  $G2 = 354.638 \pm 27.673$ ). La GSH-PX tuvo una mayor actividad en el grupo 1 que en el grupo 2 ( $G1 = 14.548 \pm 2.429$  Vs  $G2 = 6.284 \pm 1.004$ ). No se encontraron diferencias significativas en la cantidad de productos finales a la LPO (TBARS). Los niveles de cortisol ( $G1 = 4.022 \pm 0.879$  Vs  $G2 = 1.766 \pm 0.165$ ) se encontraron dentro del rango aún en vacas próximas al parto, debido a que las condiciones de manejo y alimentación son óptimas para el bienestar animal. Las concentraciones de cortisol y la capacidad antioxidante fueron mayores en el grupo 1 que en el grupo 2, esto probablemente se deba a la demanda fisiológica en la producción láctea y el mantenimiento de la preñez.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Radicales libres, antioxidantes y estrés oxidativo.

El metabolismo animal está basado en distintas reacciones químicas, todas ellas sincronizadas entre sí y finamente reguladas por la célula, cuyo objetivo es mantener la homeostasis de los individuos.<sup>1</sup> La oxidación y la reducción son reacciones bioquímicas complementarias en las que existe transferencia de electrones; cuando una especie química pierde electrones se oxida, mientras que otra los acepta y se reduce.<sup>1</sup> La actividad celular se lleva a cabo gracias a la oxidación de compuestos, como la glucosa y los ácidos grasos principalmente, quienes liberan a nivel mitocondrial un flujo de electrones que son transferidos al oxígeno por medio de acarreadores (cadena respiratoria).<sup>1</sup> Este flujo de electrones propicia la producción de ATP mediante la fosforilación oxidativa.<sup>1, 2</sup> Sin embargo, cuando el oxígeno no es reducido completamente, la transferencia de electrones produce moléculas identificadas como Radicales Libres de oxígeno.<sup>3</sup>

Los Radicales Libres (RL) son átomos o moléculas que poseen uno o más electrones no apareados en su última órbita, es decir, se encuentran dispuestos en números impares. Esta característica les genera una configuración muy inestable que incrementa su reactividad actuando principalmente como agentes oxidantes. Ellos, al estar presentes en la célula, sustraen un electrón o un átomo de hidrógeno de otra molécula. Los ácidos nucleicos, lípidos o proteínas son moléculas altamente sensibles al ataque de los RL, alterando su estructura, modificando su función y provocando su

destrucción. El daño celular es de tal magnitud que se convierte en un factor inductor de apoptosis celular.<sup>3, 4, 5, 6, 7</sup>

A los RL se les identifica mediante un punto colocado a manera de superíndice en el ángulo derecho de la fórmula química del mismo, lo que significa que el electrón no tiene pareja.<sup>2</sup>

Los RL pueden clasificarse según el átomo que posee el electrón desapareado, así se tienen RL centrados o vinculados con el oxígeno, con el nitrógeno o con el carbono. Es importante mencionar que estos últimos, (los centrados en el carbono) no tienen tanta importancia pues son el resultado de la reacción de los RL derivados del oxígeno y del nitrógeno sobre diversos tipos de biomoléculas.<sup>2</sup>

En los sistemas biológicos, los RL derivados del oxígeno son los más importantes debido a que participan en distintos fenómenos fisiológicos. Sin embargo, se debe hacer mención de que existen compuestos, no radicales, que pueden funcionar como agentes oxidantes dado que se convierten con facilidad en radicales. Estas formas moleculares reciben el nombre de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO).<sup>2, 3, 5, 7</sup> En el cuadro 1 se observa su clasificación:

Cuadro 1. Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)	
Radicales	No Radicales
Superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ )	Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )
Hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ )	Ácido hipocloroso ( $HOCl$ )
Peroxilo ( $RO_2^{\bullet}$ )	Ozono ( $O_3$ )
Alcoxil ( $RO^{\bullet}$ )	Singulete de oxígeno ( $^1O_2^*$ )
Hidroxi-peroxil ( $HO_2^{\bullet}$ )	

Tomado de Halliwell, 1999 y Castrejón, 2009.

De manera constante, los seres vivos producen RL como resultado del metabolismo de diversas sustancias, pero también el ambiente en que se desarrollan contribuye a que se expongan a los RL formados fuera del organismo. Por lo anterior se considera que los RL provienen de fuentes endógenas y exógenas que se describirán a continuación:

🌿 Fuentes endógenas.

1) Metabolismo intermediario. Se trata de procesos metabólicos normales efectuados en el organismo:

a) Cadena respiratoria. En el metabolismo aeróbico normal, la mitocondria consume oxígeno, el cual se reduce hasta obtener agua; sin embargo una pequeña parte del oxígeno molecular (1-2 % de los átomos de oxígeno) se metaboliza vía reducción univalente generando como producto intermedio al radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), quien se dismuta o desproporciona y da origen al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).<sup>2, 8, 9</sup>

b) Metabolismo de ácidos grasos. Los peroxisomas son organelos de una sola membrana que se observan como vesículas circulares u ovoides de aproximadamente 0.1 a 1.0  $\mu m$ , muy abundantes en el hígado y riñón. La matriz de los peroxisomas contiene más de 50 enzimas relacionadas con diferentes vías metabólicas; en ellos se lleva a cabo del 5-10 % de la oxidación total de los ácidos grasos, empleando sistemas de oxidasas mixtas (oxidán dos sustratos simultáneamente), las cuales sustraen electrones de hidrógeno de ácidos grasos y de equivalentes de oxido-reducción en forma de NAD (P) reducido para generar  $H_2O_2$  en presencia de oxígeno.<sup>2, 10</sup>

c) Metabolismo de purinas. La enzima xantina-oxidasa es el catalizador de las reacciones finales del metabolismo de las purinas. Se encarga de oxidar la hipoxantina y la xantina hasta sintetizar ácido úrico como desecho final, proceso durante el cual se acopla una reducción del oxígeno ( $O_2$ ) a radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) y posteriormente a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).<sup>2,7</sup>

d) Síntesis de eicosanoides. Los eicosanoides son derivados del ácido araquidónico que fungen como mensajeros intercelulares. Dentro de este grupo se encuentran las prostaglandinas, los tromboxanos y los leucotrienos. Muchos de ellos se consideran endoperóxidos cíclicos y resultan de reacciones que catalizan oxidasas mixtas y generan peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Se sintetizan en casi todos los tejidos, especialmente en leucocitos y neuronas.<sup>2</sup>

e) Catabolismo de neurotransmisores. En ciertas neuronas, la desaminación de catecolaminas (adrenalina, noradrenalina y dopamina) llevada a cabo por la monoaminoxidasa produce peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).<sup>2</sup>

2) Fagocitosis. Existen células especializadas (macrófagos, neutrófilos, monocitos) que engloban y destruyen partículas que pueden resultar peligrosas para el organismo (bacterias, virus) gracias al empleo de un proceso conocido como “estallido respiratorio”, donde el complejo enzimático de la NADPH oxidasa de la membrana celular leucocitaria cataliza la conversión de oxígeno ( $O_2$ ) en radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) debido a la oxidación de  $NADPH+H^+$ . La enzima superóxido dismutasa

(SOD) en presencia de  $H^+$  transforma al radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) para obtener peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), quien a su vez es empleado para producir radicales haluro (ácido hipocloroso); este ambiente también se caracteriza por niveles elevados de Hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ); así el “estallido respiratorio” produce una gran variedad de ERO que contribuyen a la lisis de las bacterias, evitando de este modo, un proceso infeccioso.<sup>2, 8, 11</sup>

3) Metabolismo de xenobióticos. Se entiende por xenobióticos a las sustancias producidas fuera del sistema biológico que se pueden procesar metabólicamente, sin ser un combustible energético o una coenzima. Dentro de este grupo se encuentran fármacos, colorantes, conservadores, edulcorantes, saborizantes y tóxicos. El organismo debe ser capaz de excretar estas sustancias con facilidad para evitar que interfieran con las funciones celulares; los órganos encargados de realizar esta tarea son el hígado y el riñón. Dentro de la célula el organelo que debe metabolizar este tipo de compuestos es el retículo endoplásmico liso, dentro del cual se localizan diferentes tipos de oxidasas, quienes están organizadas en distintos complejos multienzimáticos. El complejo más conocido es el citocromo  $P_{450}$ , encargado de metabolizar sustancias, habitualmente de origen vegetal mediante la catálisis oxidativa univalente. De manera general, esta reacción necesita NADPH y un sustrato orgánico, sin embargo, algunas isoenzimas reducen directamente el oxígeno ( $O_2$ ) a radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), por lo anterior es posible que la producción crónica de  $O_2^{\bullet-}$  por parte del citocromo  $P_{450}$  a la larga resulte dañina para la célula.<sup>2, 8, 12</sup> Un ejemplo muy claro del proceso de desintoxicación es el que se lleva a

cabo con el alcohol (etanol). Se sabe que existen diversas rutas metabólicas en las que el etanol se oxida hasta obtener acetaldehído y ácido acético, quien se incorpora al ciclo de los ácidos tricarboxílicos en forma de acetil-CoA y es procesado como cualquier sustrato oxidable. En ciertos puntos de esta ruta metabólica el etanol y los productos generados de estas reacciones liberan peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). El  $H_2O_2$  en presencia de iones metálicos de transición (hierro, cobre), que funcionan como cofactores de distintas enzimas, inicia la formación del radical hidroxilo ( $OH^\bullet$ ), incrementando la producción de RL. Debe recordarse que el proceso antes descrito se lleva a cabo de manera similar por otro tipo de xenobióticos.<sup>2</sup>

#### 🌿 Fuentes exógenas

- 1) Radiaciones ionizantes. Se entiende por radiación al proceso de emisión de energía por parte de los cuerpos. Las radiaciones ionizantes son radiaciones de tipo electromagnético que tienen la energía suficiente para romper las uniones moleculares pues excitan electrones ubicados en los orbitales externos de los átomos, formando iones. La transferencia de dichos electrones a otros átomos provoca la formación de RL por ello, una excesiva radiación sobre los organismos biológicos llega a lesionar células y tejidos. Los principales tipos de radiación son la luz solar, los rayos X,  $\gamma$ , UV e infrarrojos.<sup>2, 13, 14</sup>
- 2) Pesticidas o plaguicidas. Según la FAO, un plaguicida es cualquier producto químico utilizado para prevenir, destruir o controlar plagas

(animales, vegetales o microorganismos perjudiciales). Actualmente se cuenta con herbicidas, insecticidas, fungicidas, nematocidas y rodenticidas empleados para este fin. Por desgracia, estos productos tienen importantes consecuencias en la salud animal y humana. El efecto tóxico producido puede ser agudo, provocando la muerte o crónico en donde puede generar cáncer, deficiencias reproductivas, inhibición del crecimiento, efectos teratogénicos.<sup>15</sup> Existen diversos estudios que indican que las patologías antes mencionadas se deben a la generación de ERO, sin embargo, el mecanismo involucrado todavía no se ha caracterizado. Se propone que la activación del citocromo P<sub>450</sub> y los complejos de la cadena respiratoria en la mitocondria son las posibles vías empleadas por los organismos biológicos para la producción de ERO.<sup>16, 17</sup>

- 3) Micotoxinas. Existen diversas investigaciones que indican que las micotoxinas tienen actividad tóxica, mutagénica y carcinogénica.<sup>18, 19, 20, 21, 22, 23</sup> Un ejemplo muy claro es la aflatoxina B<sub>1</sub>, sintetizada durante el metabolismo secundario de algunas cepas de *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* y *A. pseudotamarii*.<sup>24, 25</sup> Se le vincula con la incidencia de neoplasias gastrointestinales y hepáticas en países de África, Filipinas y China; tienen un importante papel en la etiología de cáncer hepático, sobre todo en aquellos individuos portadores del virus de la hepatitis B. También se ha asociado con desórdenes en el crecimiento.<sup>23, 26, 27, 28</sup>

Como se había mencionado anteriormente, una vez formadas las ERO, son capaces de reaccionar rápidamente con la molécula vecina. La mayoría de las

macromoléculas biológicas pueden ser oxidadas, sin embargo, los lípidos representan el grupo más susceptible pues constituyen gran parte del organelo celular más expuesto, que es la membrana.<sup>5, 8</sup> La peroxidación de lípidos o lipoperoxidación (LPO) se inicia cuando la molécula reactiva (RL) tiene la capacidad de atacar un ácido graso poliinsaturado (conocido como PUFA, por sus siglas en inglés) sustrayendo un átomo de hidrógeno al carbono adyacente al doble enlace, posteriormente esta molécula toma un átomo de oxígeno (O<sub>2</sub>) y se transforma en peroxiloácido graso, un radical libre, que busca estabilizar su estructura química y toma un electrón de otro ácido graso polinsaturado, generándose así una reacción en cadena.<sup>2, 5, 8</sup> Además de los lípidos peroxidados que al degradarse originan nuevos RL, la LPO forma una amplia variedad de compuestos citotóxicos como los aldehídos, donde el 4-hidroxinonenal (4-HNE) y el malondialdehído (MDA) son los más importantes. Se sabe que el MDA es mutagénico en bacterias y células de mamíferos, también se le considera un producto carcinogénico para las ratas.<sup>8, 29</sup> El daño ocasionado por la LPO se hace más evidente en las membranas celulares o subcelulares puesto que altera su cohesión, fluidez, permeabilidad y función metabólica.<sup>8</sup> Debido a lo anterior, es lógico asociar la LPO con la etiología de diversos padecimientos como la arteroesclerosis, la artritis reumatoide, el enfisema pulmonar, el cáncer y el proceso de envejecimiento.<sup>5</sup>

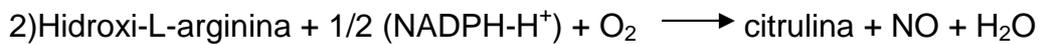
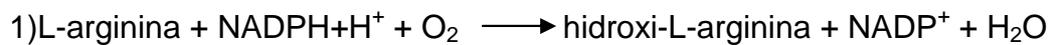
Por otro lado, las proteínas, péptidos y aminoácidos también constituyen un blanco para las ERO. Se ha observado que la presencia de cantidades significantes de aminoácidos aromáticos o sulfurados en una estructura proteínica la tornan más vulnerable a los RL, como es el caso de las cadenas laterales de la tirosina, la fenilalanina, el triptofano, la histidina, la metionina y la

cisteína.<sup>5, 30</sup> Estudios *in vitro* precisan que las proteínas sufren alteraciones localizadas en los sitios ligados a metales de transición (hierro y cobre), quienes son particularmente susceptibles debido a la facilidad con que los metales ligados reaccionan con el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) para formar radicales hidroxilo ( $OH\cdot$ ) que, posteriormente atacan a los aminoácidos adyacentes. Los productos del daño oxidativo de proteínas son la formación de peróxidos y carbonilos.<sup>31</sup>

De igual forma, el ADN sufre alteraciones causadas por RL, principalmente el ADN mitocondrial, pues se encuentra expuesto a un flujo constante de ERO provenientes de la cadena respiratoria.<sup>32</sup> Sin embargo, de manera general, los principales trastornos que puede sufrir el ADN son la oxidación de desoxirribosas, la ruptura y entrecruzamiento de cadenas y la modificación de bases nitrogenadas. Estas últimas se deben a los metales de transición, fundamentalmente al ion ferroso ( $Fe^{2+}$ ), que se encuentra unido al ADN y que, en presencia de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), genera hidroxilo ( $OH\cdot$ ) que modifica las bases del mismo. El hidroxilo puede atacar tanto purinas como pirimidinas. El daño será significativo aunque sea muy limitado en extensión y localización, si las alteraciones son capaces de eludir los sistemas de reparación antes de que ocurra la replicación; esto conduce a la producción de genes mutados y, por ende, de proteínas disfuncionales.<sup>5, 31</sup>

Es importante mencionar que existen moléculas generadas a partir del óxido nítrico ( $NO\cdot$ ) que poseen propiedades reactivas, por ello se les conoce como Especies Reactivas al Nitrógeno (ERN).<sup>33</sup>

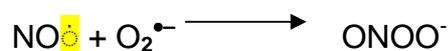
El óxido nítrico es un gas sintetizado por un gran número de células y actúa como una importante molécula de señalización biológica en diversos procesos fisiológicos, incluyendo la neurotransmisión, la regulación de la presión arterial, la relajación del músculo liso y la regulación inmunitaria.<sup>34, 35</sup> En los sistemas biológicos, el NO se forma por la combinación enzimática de un átomo de nitrógeno del grupo guanidino del aminoácido L-arginina con un átomo de oxígeno. En dicha síntesis ocurren las siguientes reacciones:



Ambas reacciones son catalizadas por la Óxido nítrico sintasa (NOS). Durante estas reacciones hay una transferencia de cinco electrones.

En los pasos posteriores a la síntesis hay oxidaciones multifuncionales en las cuales los electrones requeridos para reducir cada  $\text{O}_2$  provienen del NADPH y del aminoácido. En el paso número uno, el NADPH aporta dos electrones y un nitrógeno del grupo guanidino de la arginina sufre una oxidación por dos electrones. En el paso dos, el NADPH suministra un electrón y la hidroxiarginina sufre una oxidación de tres electrones para formar citrulina y NO.

Es importante mencionar que cuando el NO se combina con el radical superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) se produce el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), considerado un no radical:



Se debe aclarar que la formación de peroxinitrito depende de la reacción que ocurre entre el radical superóxido y la superóxido dismutasa (SOD) porque ambas reacciones compiten por el  $O_2^{\bullet-}$ .

En organismos en los que el dióxido de carbono se encuentra de manera abundante, el peroxinitrito tiende a reaccionar con éste y forma el nitrosoperoxicarbonato que posteriormente se convierte en anión nitrocarbonato, lo anterior se explica en la siguiente reacción:



Se cree que el nitrocarbonato es el oxidante responsable de las reacciones en las que participa el peroxinitrito. A este último se le considera un excelente microbicida porque tiende a iniciar la peroxidación de lípidos, el daño al ADN, nitrosar y oxidar sustratos.

El peroxinitrito también puede reaccionar con el  $NO^\bullet$  y el  $O_2^{\bullet-}$  en forma de gas como en el aire o en un medio hidrofóbico y producir al radical dióxido de nitrógeno ( $\bullet NO_2$ ) que a su vez puede generar tetróxido dinitrógeno ( $N_2O_4$ ) y trióxido dinitrógeno ( $N_2O_3$ ) considerados no radicales.

Hablando específicamente del dióxido de nitrógeno, es importante mencionar que se le considera un radical altamente reactivo capaz de iniciar la peroxidación de lípidos, oxidar grupos tiol y nitrosar grupos aromáticos. In vivo, el  $\bullet NO_2$  se genera en las capas hidrofóbicas de las membranas celulares pues todo indica que, en un medio acuoso, la reacción que se suscita es totalmente diferente y por lo tanto no existe dicha formación.

Como ya se ha descrito, ERO y ERN se producen constantemente y de forma inevitable durante los procesos metabólicos, por ello las células han desarrollado mecanismos que las protegen de sus efectos nocivos, empleando un sistema de defensa constituido por los agentes antioxidantes.<sup>5, 8</sup>

Un agente antioxidante es cualquier sustancia que al estar presente en baja concentración con respecto a un sustrato oxidable, retrasa o inhibe significativamente la oxidación del sustrato.<sup>36</sup>

Los agentes antioxidantes pueden dividirse en dos grandes grupos debido a los componentes estructurales de sus moléculas, así encontramos al sistema antioxidante enzimático y al sistema antioxidante no enzimático.

-Sistema antioxidante enzimático. Cataliza la transferencia de electrones desde un sustrato hacia los RL, posteriormente éstos sustratos, también llamados agentes reductores, utilizados en estas reacciones se regeneran gracias al NADPH producido en las diferentes vías metabólicas para estar activos nuevamente.<sup>37</sup> Su función es regulada según los requerimientos celulares ya que pueden ser inducidos, inhibidos o activados por efectores endógenos.<sup>38</sup>

Dentro de este sistema se encuentran:

✓ Superóxido Dismutasa (SOD). Es una metaloenzima que presenta tres isoformas, dependiendo del metal que contenga, la Cu/Zn-SOD que se localiza en el citosol, la Mn-SOD que se encuentra en la matriz mitocondrial y la Ec-SOD que se ubica extracelularmente en el endotelio y el epitelio alveolar.<sup>4, 37, 39,</sup>

<sup>40</sup> Su función es catalizar la dismutación del radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).<sup>40, 41</sup>



### ✓Catalasa (CAT)

Se trata de una hemoproteína dividida en cuatro unidades cada una con un grupo hem; se encuentra principalmente en los peroxisomas y su función es descomponer el exceso de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en agua ( $H_2O$ ) y oxígeno ( $O_2$ ).<sup>8, 33, 40, 42</sup> Se puede decir que trabaja sucesivamente con la SOD, pues el producto de ésta es el sustrato de la CAT.<sup>2</sup>



### ✓Glutathión Reducido (GSH)

Es un tripéptido (glu-cys-gly) que posee un grupo sulfhidrilo reductor, muy abundante en el citosol, los núcleos y las mitocondrias, siendo el principal antioxidante soluble en estos compartimentos celulares.<sup>2, 43, 44</sup> Participa en varios eventos fisiológicos tales como el transporte de aminoácidos, a través de la membrana plasmática, es el sustrato de la enzima Glutathión peroxidasa (GSH-Px), neutraliza al radical hidroxilo y al oxígeno singlete, además de regenerar a otros antioxidantes como la vitamina E y la C cuando se encuentran oxidadas.<sup>42, 45</sup>

### ✓Glutathión Peroxidasa (GSH-Px)

Es una enzima selenio-dependiente que cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno en agua empleando al glutathión reducido (GSH) como donador de electrones.<sup>33, 40, 42</sup>



Se han descrito tres isoformas, la GSH-Px clásica que está en casi todas las células y que se emplea como indicador para evaluar el balance metabólico del Se en bovinos y ovinos puesto que existe una alta correlación entre su actividad sanguínea y la concentración plasmática de dicho mineral.<sup>46, 47</sup>

La GSH-Px fosfolípido hidroperóxido, encargada de proteger a la célula de la LPO reduciendo hidroperóxidos de ácidos grasos en las membranas celulares y previniendo la oxidación de lipoproteínas de baja densidad.<sup>48, 49</sup>

La GSH-Px gastrointestinal tiene como tarea reducir los hidroperóxidos provenientes del colesterol y de la dieta.<sup>50</sup>

#### ✓Glutación Reductasa (GR)

Convierte al glutación oxidado (GSSG) en glutación reducido (GSH) empleando a NADPH con el objetivo de que no se agoten las reservas de GSH.<sup>40, 42</sup>



-Sistema antioxidante no enzimático. Son moléculas que capturan RL y generan compuestos químicos menos dañinos para la célula.<sup>40, 41</sup> Según su afinidad se dividen en antioxidantes hidrofóbicos (vitamina E) o hidrofílicos (vitamina C).

#### ✓Vitamina E

Posee ocho isómeros estructurales de tocoferol, sin embargo el compuesto más activo es el  $\alpha$ -tocoferol.<sup>51, 52</sup> Se encuentra en aceites vegetales. Su tarea es neutralizar radicales superóxido, hidroxil y peroxil donándoles un electrón, entonces se oxida y se convierte en RL tocoferoxilo, el que regresa a su estado

original gracias a la vitamina C y a la coenzima Q.<sup>37, 51</sup> Gracias a este mecanismo, es capaz de detener la reacción en cadena generada en la LPO.

Reportes de algunos estudios mencionan que el empleo de vitamina E en la dieta de rumiantes disminuye la incidencia de enfermedades, mejora el sistema inmune y por ende la producción.<sup>7</sup>

#### ✓Vitamina C o ácido ascórbico

Neutraliza a los radicales superóxido, hidroxilo y peróxido de hidrógeno; ayuda a la vitamina E a regresar a su estado original. Durante este proceso, la vitamina C se transforma en RL deshidroascorbato, sin embargo puede reducirse nuevamente gracias a enzimas o sustratos celulares tiólicos.<sup>8</sup> Se encuentra en alimentos como cítricos, papas y tomates.<sup>52</sup>

#### ✓Coenzima Q o Ubiquinona

Es un derivado de la quinona, su estructura es semejante al tocoferol; el 50 % de la ubiquinona celular se encuentra en la mitocondria.<sup>53, 54</sup> Se sabe que el ubiquinol, que es su forma reducida tiene fuerte actividad antioxidante, consumiéndose antes que la vitamina E, en exposición a RL. Impide que las ERO desencadenen la LPO.<sup>54, 55</sup>

En ocasiones, los sistemas de protección antioxidante son insuficientes para neutralizar las ERO generadas, desarrollándose un estado de desequilibrio que se conoce como Estrés Oxidativo (EO).<sup>8, 12, 56</sup>

Al EO se le ha relacionado con una infinidad de padecimientos en seres humanos y animales, de hecho múltiples estudios sugieren que el EO tiene un papel importante en la génesis de distintos desórdenes en el ganado lechero

puesto que la suplementación con ciertos antioxidantes pueden mejorar la severidad de enfermedades metabólicas e infecciosas.<sup>12, 56, 57</sup> Por ello se han desarrollado diversos métodos para evaluar el grado de estrés oxidativo en los seres vivos y mediante una dieta balanceada y con la cantidad exacta de antioxidantes, prevenir este tipo de padecimientos. Dentro de éstas técnicas se encuentran:

- ✓ Cuantificación en plasma de productos finales de la LPO como las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) o malondialdehídos (MDA).<sup>8, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64</sup>
- ✓ Análisis de la reducción férrica en plasma (FRAP).<sup>65, 66, 67, 68, 69</sup>
- ✓ Actividad enzimática de la glutatión peroxidasa (GSH-Px),<sup>70, 71, 72</sup> catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD).<sup>58</sup>
- ✓ Cuantificación de antioxidantes como glutatión, tocoferoles, selenio, vitamina C por HPLC.<sup>7, 73</sup>

Por otro lado, existe literatura que menciona que el estrés oxidativo puede incrementarse cuando los organismos entran en un periodo de estrés fisiológico.

## 1.2 Estrés

El término “estrés” proviene del latín *stringere* que quiere decir oprimir, también se relaciona con el vocablo inglés *strain* que significa tensión y en el caso de los organismos vivos se emplea para describir ciertos cambios fisiológicos derivados de estímulos a los que dichos organismos se encuentran expuestos.<sup>74</sup>

En 1920, Walter B. Cannon empleó por primera vez el término estrés para referirse a las condiciones (internas y externas) bajo las cuales el organismo restaura el equilibrio del medio interno mediante la activación del sistema nervioso simpático.<sup>75, 76</sup> Propuso la existencia de una hormona que preparaba al individuo para huir o pelear, explicando el incremento en la secreción de adrenalina después de la exposición del organismo a cualquier estrés agudo, demostrando que esto ocurre como una forma de adaptación a la situación de estrés.<sup>77</sup>

Posteriormente en 1936, Hans Selye definió al estrés como “el estado del organismo manifestado por un síndrome inespecífico que consiste en una serie de cambios dentro del sistema biológico que buscan hacer frente a la emergencia”.<sup>78</sup>

El estrés posee tres componentes:

- 1) El estresor. Se trata de cualquier estímulo, externo o interno (físico, químico, acústico, fisiológico) que de manera directa o indirecta propicia un desequilibrio en la homeostasis del organismo. Pueden ejercer su acción de manera crónica o aguda.<sup>74</sup>
- 2) La respuesta del organismo al estresor. Es el conjunto de reacciones fisiológicas dirigidas a reestablecer la homeostasis del individuo; se puede considerar un mecanismo adaptativo pero si el estresor persiste por periodos prolongados puede ser nocivo ya que el estrés crónico conlleva a múltiples estados patológicos.<sup>74</sup>
- 3) Los estados fisiológicos intermediarios entre el estresor y la reacción corporal.<sup>74</sup>

El “Síndrome General de Adaptación”,<sup>79</sup> es un proceso bajo el cual ocurren cambios fisiológicos que dependerán de la duración de los agentes estresores.<sup>80, 81</sup> Dicho síndrome se divide en tres etapas:

- 1) Alarma. En esta etapa el organismo advierte la presencia del estresor y activa su sistema nervioso simpático, secretando noradrenalina y liberando adrenalina y glucocorticoides proporcionados por la médula y la corteza de las glándulas adrenales, respectivamente, con la finalidad de movilizar los recursos.<sup>74, 79</sup> Es importante mencionar que la adrenalina induce, a través del receptor  $\alpha$ , la producción de  $H_2O_2$  en el hígado.<sup>82</sup> También aumenta la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca.<sup>76, 78</sup>
- 2) Resistencia o adaptación. El sistema biológico enfrenta al estresor llevando a cabo ajustes que le permitan utilizar de manera más eficiente la energía disponible, algunos de ellos son: secreción de prolactina para inhibir la función del sistema reproductivo; secreción de endorfinas y encefalinas encargadas de suprimir la percepción del dolor; transformación del glucógeno hepático en glucosa y salida de proteínas y lípidos de los adipositos; incremento en la entrada de oxígeno mediante aumento en la tasa respiratoria; secreción de arginina-vasopresina que eleva la presión arterial con la finalidad de obtener un mayor flujo sanguíneo y energético a los músculos y regular el balance de fluidos y electrolitos corporales e incremento en la actividad del sistema inmune.<sup>74, 79</sup>
- 3) Desgaste o agotamiento. El organismo ha gastado demasiada

energía en mantener su reacción defensiva; cuando se le agotan los recursos, su resistencia ante las enfermedades disminuye porque se inhiben las funciones de las células de defensa (macrófagos, monocitos, linfocitos B y T) y es fácil que desarrolle diversas enfermedades. Además la eficiencia reproductiva se altera pues la producción de hormonas (LH, FSH y testosterona) disminuye. En algunos casos, el estrés prolongado puede ser fatal.<sup>74, 79, 83</sup>

El organismo animal reacciona al estrés a través del sistema nervioso autónomo (SNA) y el eje hipotálamo-hipofisario-adrenocortical (HHA).<sup>83</sup>

El sistema nervioso autónomo se encarga de mantener el equilibrio fisiológico (la homeostasis), para ello posee dos ramas: el sistema nervioso simpático que permite hacer frente a la situación estresante y el sistema nervioso parasimpático que interviene en la recuperación y relajación después de una situación estresante.<sup>83, 84</sup>

Cuando se presenta un estímulo estresante, el núcleo paraventricular del hipotálamo produce al factor liberador de corticotropina (CRH), el cual es transportado a través de los capilares del sistema circulatorio portahipofisario a las células corticotrópicas de la adenohipófisis, quienes a su vez liberan a la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), que viaja por el torrente sanguíneo hasta llegar a la zona fascicular de la corteza de las glándulas adrenales, la cual se encarga de la biosíntesis y liberación de glucocorticoides al torrente sanguíneo, especialmente del cortisol, y saliva.<sup>84</sup>

El cortisol es una hormona que produce aumento de la presión sanguínea, glucemia e inmunodepresión;<sup>85, 86</sup> tiene actividad proteolítica y lipolítica, lo que

resulta en la secreción de ácidos grasos libres y glicerol. En el hígado induce la gluconeogénesis y la síntesis de proteínas.<sup>86, 87</sup>

El cortisol ha sido el glucocorticoide más usado para evaluar estrés.<sup>88, 89, 90</sup> Se ha medido en plasma, suero, heces fecales, saliva<sup>91, 92, 93, 94</sup> y últimamente en el pelo de bovinos y bisontes.<sup>84, 95</sup>

En bovinos, los niveles fisiológicos normales de cortisol son inferiores a 12 ng/ml, sin embargo pueden aumentar drásticamente después de una exposición a situaciones dolorosas o adversas.<sup>90</sup> Se sabe que los niveles de cortisol en vacas gestantes oscilan entre 2 y 10 ng/ml.<sup>95, 96, 97</sup>

### 1.3 Gestación

La gestación es el desarrollo intrauterino de un organismo. Se divide en dos periodos: el embrionario que abarca desde la fertilización del óvulo hasta los 45 días y el fetal que va desde el día 46 hasta el parto.<sup>98, 99</sup>

En bovinos, la gestación tiene una duración de 282 días, pudiendo variar de 279 hasta 290 días.<sup>100, 101, 102</sup>

Conforme avanza la gestación, la madre sufre cambios y adaptaciones físicas y fisiológicas, entre las cuales están:

- La vulva se torna edematosa a partir del quinto mes de gestación.<sup>98, 99</sup>
- El cérvix se encuentra bloqueado por un tapón mucoso que se diluye durante el parto.<sup>98, 99</sup>

- El útero se expande según el tamaño del feto y el miometrio se encuentra inactivado para evitar la pérdida o expulsión prematura de la cría.<sup>98, 99</sup>
- Se suspenden los ciclos estrales debido a la presencia del cuerpo lúteo.<sup>98, 99</sup>
- Conforme avanza la gestación los ligamentos pélvicos se relajan.<sup>98</sup>
- Aumenta la retención de calcio, fósforo y hierro.<sup>98</sup>
- Durante las últimas tres semanas de gestación, la ingesta de alimento se reduce pues el útero ocupa una gran parte de la cavidad abdominal y no permite que el rumen se expanda correctamente.<sup>103</sup>

Por lo anterior, podemos decir que la gestación es un periodo crítico porque ocurre la formación de dos productos, el feto y la placenta, debido a esto hay una demanda energética elevada y un incremento en los requerimientos de oxígeno, lo cual resulta en una posible elevación en la concentración de las ERO.<sup>56, 104</sup>

## **1.4 Justificación**

Existen datos en la literatura que sugieren que la vaca durante la gestación desarrolla un cuadro de estrés oxidativo y un cuadro de estrés fisiológico; sin embargo, no se ha reportado evidencia experimental que relacione ambos tipos de estrés. El presente trabajo explora la posible relación entre ellos durante el periodo de gestación en vacas lecheras en pastoreo,

## **1.5 Hipótesis**

Existe una correlación positiva entre el estrés fisiológico y estrés oxidativo en vacas lecheras en pastoreo durante la gestación.

## **1.6 Objetivo General**

Identificar la presencia de un cuadro de estrés oxidativo y de estrés fisiológico en vacas lecheras en pastoreo a través de indicadores metabólicos (FRAP, TBARS, GSH-Px y cortisol) para determinar si existe una relación entre ellos.

## **1.7 Objetivos Específicos**

1. Identificar si existe estrés oxidativo en vacas lecheras en pastoreo, midiendo en suero la capacidad antioxidante total (FRAP), nivel de sustancias reactivas al oxígeno (TBARS) y la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px).

2. Medir las concentraciones de cortisol en suero mediante Radioinmunoanálisis (RIA) para evaluar el estrés fisiológico presente en las vacas gestantes.

## **2. Material y Métodos**

### **2.1 Localización**

Este estudio se realizó en San José de Gracia Michoacán ubicado en el Municipio de Marcos Castellanos Estado de Michoacán, México. Situado entre los paralelos 19°59' de latitud Norte y 103°01' de longitud Oeste, a una altura de 2,000 msnm. El clima es templado con lluvias en verano; tiene una precipitación pluvial anual de 1,000 mm y temperaturas que oscilan de 10.4 a 25.4° C.<sup>105</sup>

### **2.2 Animales, manejo y diseño**

Se usaron 20 vacas Holstein (10 en el segundo tercio de la gestación y 10 próximas al parto), Las vacas se encontraban en pastoreo y contaban con comederos, bebedero y sombreaderos. Las vacas consumían pasto nativo, además eran recibían un complemento alimenticio elaborado con los siguientes ingredientes: sorgo, maíz forrajero, salvado de trigo, salvado de maíz, pasta de soya, harinolina, pasta de coco, canola, mascarrote, harina de alfalfa, gluten de maíz, germen, girasol, melaza, roca, calcio, carbonato de calcio, cloruro de sodio, sulfato de cobre y vitaminas.<sup>106</sup>

Se formaron dos grupos de vacas, Grupo 1 (n=10) en el segundo tercio de la gestación (6 meses) y Grupo 2 (n=10) próximas al parto (menos de 2 días antes del parto). Las vacas que presentaron problemas al parto (retención placentaria, mastitis o problemas en las patas) no fueron incluidas en este estudio. Las vacas del grupo 1 eran ordeñadas manualmente 2 veces al día con una producción promedio de 15 litros/día (vacas 6 meses de gestación).

### **2.3 Toma de muestras**

Se obtuvo una muestra de sangre de la vena coccígea de cada vaca (7mL)<sup>107</sup> con tubos vacutainer sin anticoagulante. Las muestras se centrifugaron 3000 rpm para obtener el suero y se guardó en tubos Eppendorf a -25 °C para su análisis en el laboratorio del Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM para la determinación de los indicadores de estrés oxidativo y al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), Laboratorio a cargo de la Dra Marta Romano Pardo para la determinación del cortisol.

### **2.4 Análisis de muestras para identificación de estrés oxidativo**

La capacidad antioxidante total se midió mediante la prueba de poder antioxidante por reducción férrica (FRAP) de acuerdo al método de Benzie y Strain (1999).<sup>66</sup> Alícuotas de 50µl se tomaron por duplicado de cada muestra; a cada una se les agregó 1.5ml de una mezcla formada por una solución amortiguadora de acetato 300mM a pH 3.6, una solución acuosa de cloruro férrico hexahidrato 20mM y 2,4,6-tripiridil-s-triazina 10mM (disuelto en HCl 40mM), en una relación 10:1:1. Las muestras se incubaron a 37°C por 10 minutos y se obtuvieron sus absorbancias a 593nm. Las muestras se protegieron de la luz todo el tiempo. Para los cálculos se realizaron curvas patrón con soluciones acuosas de FeSO<sub>4</sub> a diferentes concentraciones (0.2-3.2mM). Los resultados se presentan en nmol de Fe(II) formado por ml de suero.

La lipoperoxidación fue medida mediante la prueba de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) de acuerdo al procedimiento descrito por Ohkawa y colaboradores (1979).<sup>63</sup> Alícuotas de 100µl se tomaron por duplicado de cada muestra y se les añadió 1ml de una solución acuosa de ácido tiobarbiturico al 0.8% y 2ml de HCl al 20%. Las muestras se mantuvieron en ebullición 60 minutos y se enfriaron en hielo durante 5 minutos. Posteriormente se les agregó 5ml de n-butanol y se agitaron vigorosamente para luego centrifugarse 10 minutos a 4000 rpm. Los sobrenadantes se leyeron a 532nm para obtener las absorbancias. Los cálculos se hicieron con base a curvas patrón usando soluciones de malondialdehido (MDA) 10-80 µM, obtenido a partir de la hidrólisis ácida de 1,1,3,3-tetraetoxipropano de acuerdo a Gutteridge (1975).<sup>59</sup> Los resultados se reportan en nmol de MDA por ml de suero.

Para la actividad de la glutatión peroxidasa se empleó la técnica de Lawrence y Burk (1976).<sup>70</sup> Alícuotas de 100µl se tomaron por duplicado de cada muestra; a cada una se les agregó 800µl de una mezcla formada por solución amortiguadora de fosfatos 50mM (pH 7.0) con EDTA 1mM y NaH<sub>3</sub> 1mM, GSH (reducido) 1mM, glutatión reductasa 1U/ml y NADPH 0.2 mM. Cada prueba se acompañó de un control sin muestra para descartar la oxidación no enzimática del NADPH. Las pruebas y los controles se incubaron a temperatura ambiente 5 minutos y luego se les agregó 100µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2.5mM. La absorbancia se leyó a 340nm en los 0 y 5 minutos. El coeficiente de absorción molar del NADPH de 6,3x10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> se empleó para los cálculos. Los resultados se presentan en nmol por ml de suero.

## **2.5 Análisis de muestras para identificación de estrés fisiológico**

La concentración de cortisol en suero fue medida directamente sin extracción, se hicieron duplicados de cada muestra siguiendo las instrucciones del kit comercial (CIS <sup>125</sup>I, Laboratorios CIS®, Francia). De acuerdo con el fabricante, el kit emplea anticuerpos monoclonales altamente específicos para cortisol teniendo una reacción cruzada con otros esteroides endógenos de menos del 1%. Para cada ensayo se hizo la curva estándar a 0, 10, 50, 100, 200 and 500 ng / mL. Las concentraciones de cortisol presentes en cada una de las muestras se determinaron calculando el porcentaje de unión de esta hormona al anticuerpo específico para cortisol en fase sólida. Las mediciones se realizaron con un contador gamma (Cobra II Auto Gamma Counting System; Packard Inst. Canberra Company®). El coeficiente de variación intraensayo fue menor a 5%. El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de la regresión lineal calculada fue  $>0.98$  en el ensayo.

## **2.6 Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos se realizaron con un programa Stat-View McIntosh (1996).<sup>108</sup> Los datos presentaron una distribución normal mediante las pruebas de Sesgo y curtosis y Kolgomorov-Smirnof. Los datos obtenidos sobre estrés oxidativo y concentraciones de cortisol fueron comparados empleando la prueba T-Student para comparar las medias entre los grupos y probar la hipótesis con un nivel de significancia del 95%. Posteriormente, se aplicó la prueba de Correlación de Pearson para determinar si existía alguna correlación entre los indicadores de estrés oxidativo y el estrés fisiológico.

### 3. Resultados

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

En la Figura 1, se muestran los resultados obtenidos de la prueba de FRAP, en donde observamos que las vacas del grupo 1 (6 meses de gestación) presentaron una concentración mayor de FeII (522.944 nmoles) y las vacas del grupo 2 (dos días antes del parto) una disminución en la concentración de FeII (354.638 nmoles), la diferencia de concentración del grupo 1 contra el grupo 2, fue estadísticamente significativa ( $P < 0.005$ ).

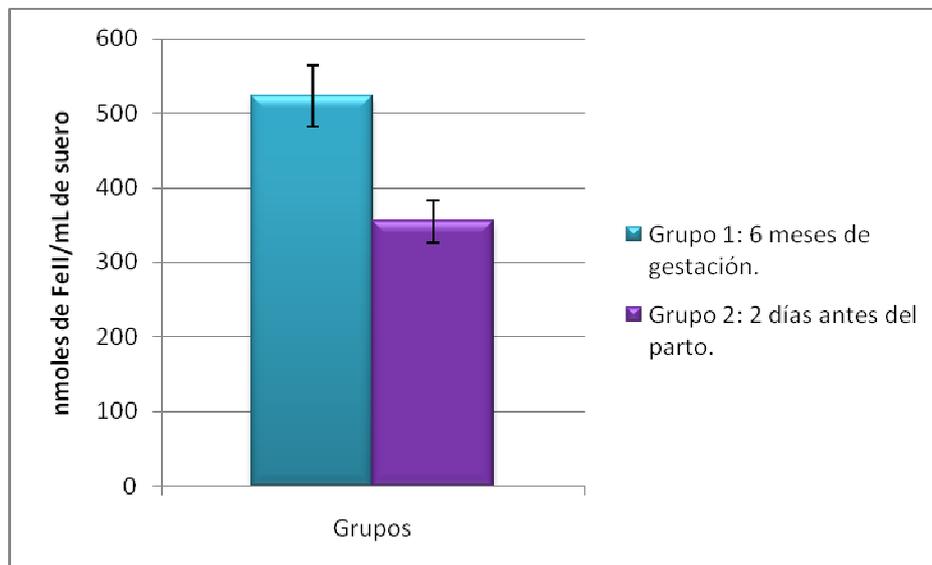


Figura 1. Capacidad antioxidante total en suero de vacas lecheras en pastoreo.

Los datos obtenidos sobre la producción de MDA en suero de vacas lecheras en pastoreo se presentan en la Figura 2, en donde no se observan diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre los grupos (Grupo1: 89.287 y Grupo 2: 42.664).

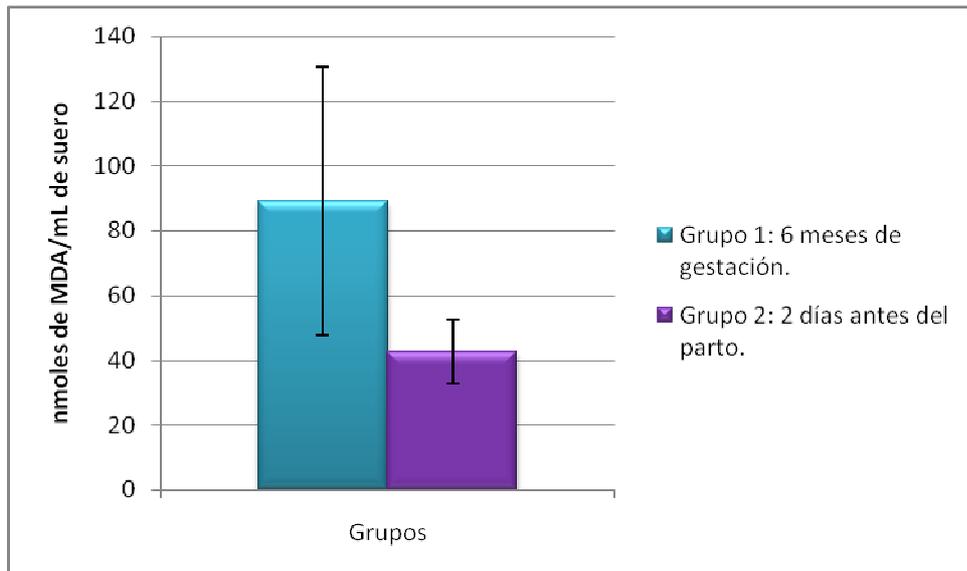


Figura 2. Niveles de MDA en suero de vacas lecheras en pastoreo.

Con respecto a la actividad de la Glutación Peroxidasa, la Figura 3 muestra una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.01$ ) en la actividad de la enzima en el grupo 2 (6.284), comparado con el grupo 1 (14.548).

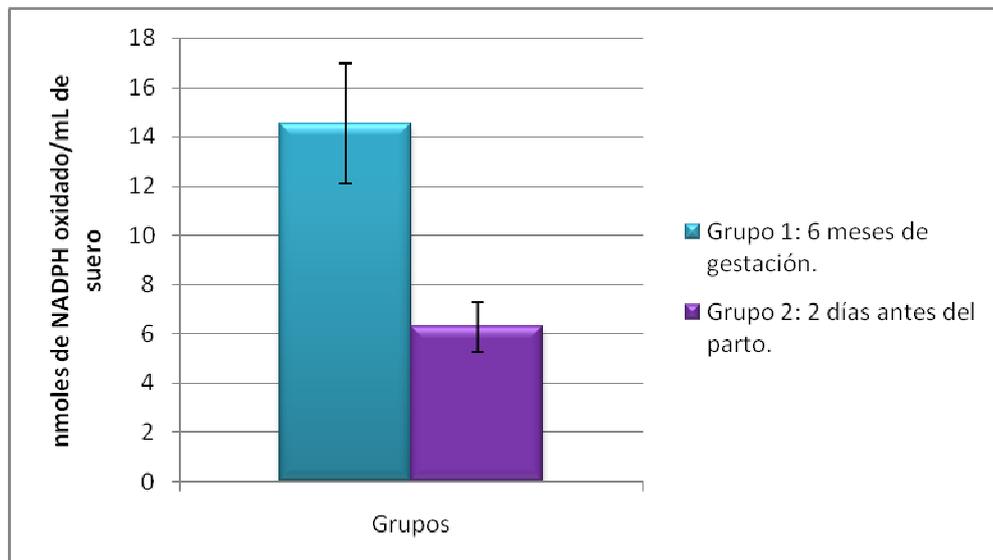


Figura 3. Niveles de NADPH oxidado en suero de vacas lecheras en pastoreo.

Las concentraciones de cortisol en suero de vaca a los 6 meses de gestación (Grupo 1) y dos días antes del parto (Grupo 2) se muestran en la Figura 4, en

donde se observa que existe una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) entre los grupos. El promedio obtenido fue de 4.022 ng/ mL y de 1.766 ng / mL de cortisol en suero para el grupo 1 y 2, respectivamente.

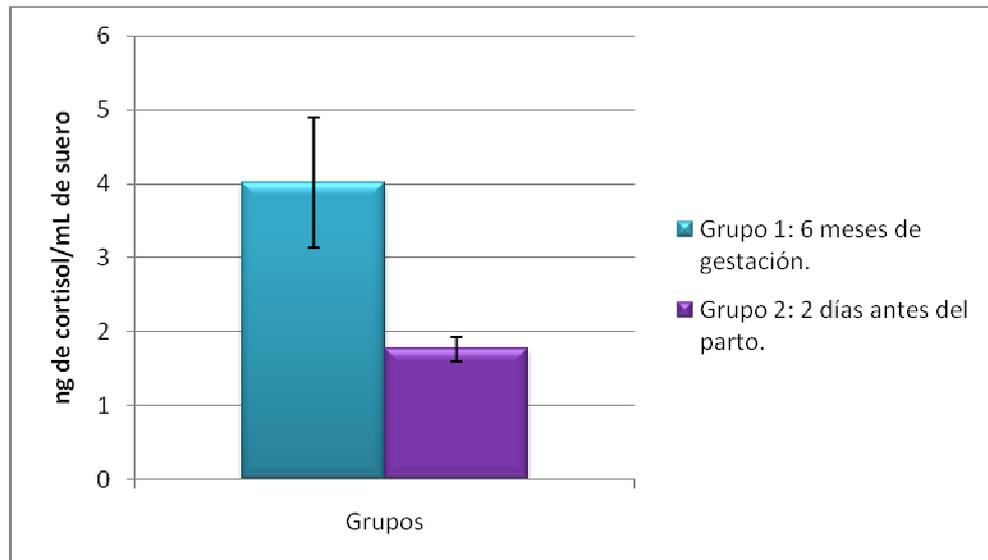


Figura 4. Concentraciones de Cortisol en suero de vacas lecheras en pastoreo.

No se observó ninguna correlación con significancia estadística ( $P > 0.05$ ) entre los indicadores de estrés oxidativo (FRAP, TBARS, GSH-Px) y el estrés fisiológico, representado por las concentraciones de cortisol en suero.

Se observó una correlación positiva ( $P < 0.05$ ) de la capacidad antioxidante (FRAP) y la actividad de la GSH-Px.

## 4 Discusión

El estrés oxidativo resulta de un incremento en la producción de radicales libres y especies reactivas del oxígeno y una disminución en la defensa antioxidante, esta situación conduce a un daño en las macromoléculas biológicas y una alteración en el metabolismo y fisiología del animal. El estrés oxidativo puede ser monitoreado a través de varios biomarcadores en el plasma.<sup>109</sup> En la actualidad, se tiene en cuenta que la medición de la actividad antioxidante total es mucho mejor índice de la fuerza antioxidante que la medición de los antioxidantes individuales.

Para este propósito, el procedimiento de FRAP utilizado en este trabajo está considerado como uno de los mejores procedimientos disponibles, puesto que excluye a los antioxidantes enzimáticos y glutatión reducido, entre otros.<sup>65</sup>

La capacidad antioxidante de las vacas fue mayor en aquellas que se encontraban en el segundo tercio de gestación (Figura 1, grupo 1) porque la demanda fisiológica no es tan alta como ocurre al final de ésta y al inicio de la lactancia, lo anterior debido a que durante las últimas 3 semanas de la gestación, la demanda de nutrientes ejercida por el feto y la placenta llegan a su máxima capacidad<sup>110</sup> y el consumo de materia seca disminuye de un 10 a 30 % debido a que el feto ocupa la mayor parte de la cavidad abdominal,<sup>103, 111</sup> lo cual es importante pues se sabe que la ingesta reducida de materia seca en el periodo de parto puede producir una lipidosis hepática que altera las funciones normales del hígado.<sup>112, 113</sup> También existe un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) propias del metabolismo embrionario,<sup>104</sup> que favorecen la disminución del estado antioxidante.<sup>114</sup> Por su

parte, Wachter et al (1999) observaron un descenso progresivo en la actividad antioxidante de vacas conforme avanzaba la lactación, debido probablemente a la pérdida de antioxidantes liposolubles en la leche. Por otro lado, Harmon et al (1997) y Calamari et al (1999) reportaron una disminución en la actividad antioxidante y una reducción en los niveles de antioxidantes lipídicos en plasma en vacas lecheras a la mitad de la lactación. Los datos aquí reportados sobre la capacidad antioxidante en suero de vacas tres días antes del parto (Fig. 1) indican que las defensas de tipo antioxidante se encuentran disminuidas previas al parto, condición que sugiere un posible cuadro de estrés oxidativo durante este periodo de transición pre y post parto, el cual puede contribuir a desordenes metabólicos que puedan ser asociados con enfermedades metabólicas relacionadas al periodo del parto.

La hidrólisis de los lípidos hidroperoxidados conduce a la formación de una mezcla de compuestos como aldehídos, alcoholes, hidrocarburos.<sup>118</sup> Un ensayo comúnmente aplicado para estimar la lipoperoxidación es la prueba del ácido tiobarbitúrico

Con respecto a la peroxidación de lípidos, según Perkins( 2006) y Walsh, Wang (1993a), la placenta humana es una fuente de los productos de lipoperoxidación durante la gestación. Sin embargo en este estudio, los niveles de MDA no muestran diferencias significativas entre los grupos (Fig. 2). Estos datos coinciden con los reportados por Bernabucci *et al*, quienes observaron cambios en los niveles de TBARS, 21 días antes y 35 después del parto. Una hipótesis podría ser que los mecanismos de defensa antioxidante fueron utilizados para evitar la acumulación de lípidos peroxidados durante la

gestación. Este efecto compensatorio puede explicar por qué la capacidad antioxidante total se vio disminuida en el segundo grupo (Fig. 1).

En cuanto al glutatión, se sabe que protege a las células contra las especies reactivas del oxígeno empleando diversos mecanismos, uno de ellos es la reacción de la GSH-Px.<sup>121</sup>

La actividad de la GSH-Px es importante en la defensa celular contra una amplia variedad de hidroperóxidos, por ejemplo peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos.<sup>122</sup> Los peróxidos son moléculas generadoras de especies reactivas del oxígeno y la GSH-Px juega un papel crítico en la protección de la célula contra el daño ocasionado por los radicales libres.<sup>122</sup> El sistema de la GSH-Px es un constituyente del mecanismo de defensa celular contra el estrés oxidativo<sup>123</sup> y en rumiantes la actividad de la GSH-Px es considerablemente alta.<sup>124</sup> La GSH-Px es una enzima que requiere, para su actividad, de selenio. Es probable que la disminución de la actividad de la GSH-Px observada en este trabajo (Fig. 3) se deba a una menor capacidad antioxidante total (Fig. 1), lo que facilitará el desarrollo de un cuadro de estrés oxidativo en la vaca lechera y posiblemente la manifestación de alteraciones metabólicas post parto.

Aunque los niveles de cortisol pueden variar por diversas razones como son el tipo de alimentación, ritmos circadianos, temperatura ambiental, época del año, así como la etapa de lactación o del ciclo estral,<sup>102, 125, 126</sup> las concentraciones observadas en este trabajo se encuentran dentro de los rangos basales reportados por González de la Vara et al (2010), Guazdauskas (1986) y Lay y col (1992).

Previo al parto, las concentraciones de cortisol en sangre aumentan<sup>95, 93, 127</sup> debido a la demanda de nutrientes y a que el feto y la vaca producen cortisol para iniciar el trabajo de parto.<sup>128,129</sup> Sin embargo, en este trabajo se observaron concentraciones de cortisol más bajas dos días antes del parto que en el segundo tercio de la gestación; esto puede deberse primero a que las vacas usadas en este estudio son multíparas con experiencia previa y segundo, al sistema de manejo y las condiciones climáticas y ambientales en las que se desarrolló esta investigación. En el manejo rutinario de estas vacas no se realizan actividades causantes de estrés como separar a la vaca de su grupo antes del parto<sup>130, 131</sup> o separar a la cría pocos días después del parto,<sup>107,132</sup> entre otros. Hopster et al., (2002) y Raussi, (2005) encontraron que los niveles de cortisol se pueden incrementar como respuesta a un manejo adverso o si los animales no se encuentran habitados al mismo lo que puede tener influencia en su bienestar y vida productiva a futuro.<sup>132, 133</sup>

Es sabido que el cortisol es una hormona metabólica que media los efectos del desgaste fisiológico que representa la preñez y la producción de leche y que estos niveles en condiciones normales se incrementan en tanto aumenta la producción láctea.<sup>101, 132</sup> Probablemente, a esto se deba que las vacas de 6 meses de gestación en este estudio presentaron niveles de cortisol más elevados que las vacas de 2 días antes del parto.

En este trabajo, no se encontró una correlación significativa entre el estrés oxidativo y el estrés fisiológico, al parecer el estrés oxidativo es independiente del estrés fisiológico. Existen distintos estudios<sup>4, 9, 12, 33, 56, 57, 58, 109, 119, 135</sup> donde se observa que el estrés oxidativo y el estrés fisiológico excesivo influyen de manera negativa sobre todo en los animales con una demanda energética y

metabólica alta. De hecho en algunos se ha buscado una alternativa para evitarlo como el empleo de tratamientos a base de vitamina E, selenio, melatonina, vitamina C entre otros, sin embargo es necesario determinar en qué etapa fisiológica y/o productiva sería necesario incluirlos para aumentar la salud y el bienestar de nuestros animales.

## **5. Conclusiones**

En esta investigación no se encontró relación entre la presentación del estrés oxidativo y estrés fisiológico. Aunque este sistema de pastoreo y manejo parece ser el óptimo para el bienestar de las vacas lecheras, es necesario hacer más estudios sobre estrés oxidativo y estrés fisiológico en otros sistemas de producción y en varias etapas de la gestación para saber en qué momento de la misma se encuentra la mayor demanda fisiológica y de antioxidantes para la vaca.

## 6. Referencias

1. Nelson DL, Cox MM. Lehninger: principles of biochemistry. 5° Ed. USA: Freeman and Company, 2008.
2. Castrejón SM. Radicales libres y sistemas antioxidantes. En: McKee T, McKee JR. Bioquímica. Las bases moleculares de la vida. 4ª ed. México: McGraw-Hill, 2009:611-628.
3. Halliwell B, Gutteridge JM. Free Radicals in biology and medicine. 3° ed. New York: Oxford Press, 1999.
4. Castillo C, Benedito JL, López-Alonso M, Miranda M, Hernández J. Importancia del estrés oxidativo en ganado vacuno: en relación con el estado fisiológico (preñez y parto) y la nutrición. Arch Med Vet; 33 (1). Available from: [http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0301732X2001000100001](http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301732X2001000100001)
5. Velázquez PM, Prieto GB, Contreras PR. El envejecimiento y los Radicales libres. Ciencias 2004 Jul-Sept; 75:36-43. Available from: [http://www.alumno.unam.mx/algo\\_leer/Envejecimiento.pdf](http://www.alumno.unam.mx/algo_leer/Envejecimiento.pdf)
6. Kietzmann T, Görlach A. Reactive oxygen species in the control of hipoxia-inducible factor mediated gene expression. Semin Cell Dev Biol 2005; 16: 474-486.
7. Huerta JM, Ortega CME, Cobos PM, Herrera HJG, Díaz-Cruz A y Guinzberg PR. Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en animales domésticos. INCI 2005; 30 (12):728-734.
8. Chihuailaf RH, Contreras PA, Wittwer FG. Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal. Vet Mex 2002; 33 (3): 265-283.
9. Pedernera RM. Energy balance, reproductive performance and metabolic stress in australian holstein-friesian cows fed to achieve low or high milk

- yield on a pasture-based system of farming (tesis de doctorado). Sidney, Australia: University of Sidney, 2008.
10. Salceda SR. Peroxisomas: Organelos polifacéticos. REB 2008; 27 (3): 85-92.
  11. Crystal RG, Ramon JR. GSH System. Glutation: eje de la defensa antioxidante. Amsterdam, Holanda: Excerpta Médica, 1992.
  12. Miller JK, Brzezinska-Slebodzinska E, Madsen FC. Oxidative stress, antioxidants and animal function. J Dairy Sci 1993; 76: 2812-2823.
  13. Bermúdez JL. Radiaciones Ionizantes. Costa Rica. Available from: <http://www.reeme.arizona.edu>
  14. Santacruz YE. La radiación gamma inductora de micronúcleos en células gaméticas de *Tradescantia* (tesis de licenciatura). México: UNAM, 1998.
  15. FAO. Lucha contra la contaminación agrícola de los recursos hídricos (Estudio FAO Riego y drenaje 55), Cap. 4: Los Plaguicidas, en cuanto contaminantes del agua. Depto de desarrollo sostenible, 1997. Available from: <http://www.fao.org/docrep/W2598S/w2598s06.htm>
  16. López GO. Influencia de la exposición crónica a plaguicidas sobre diversos marcadores bioquímicos (esterasas y enzimas antioxidantes) en trabajadores de invernadero de la costa oriental de Andalucía (tesis de doctorado). España: Universidad de Granada, 2005.
  17. Benerjee BD, Seth V, Bhattacharya A, Pasha ST, Chakraborty AK. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radicals scavengers. Toxicol Lett 1999; 107: 33-47.
  18. Abdelaziz SAE, Hamada MM. Phytic Acid exposure alters aflatoxin B1-induced reproductive and oxidative toxicity in albino rats (*Rattus norvegicus*). eCAM 2009; 6 (3):331-341.
  19. Jayashree T, Subramanyam C. Oxidative stress as a pre requisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. Free Rad Biol & Med 2000; 29 (10): 981-985.

20. Groopman JD, Busby WF, Donahue PR, Wogan GN. Aflatoxins as risk factors for liver cancer: An application of monoclonal antibodies to monitor human exposure. *Cancer Biochem Mol Epidemiol* 1986; 233-256.
21. Groopman JD, Cain LG, Kensler TW. Aflatoxin exposure in human populations: measurements and relationship to cancer. *Critical Rev Toxicol* 1988; 19: 113-145.
22. Etzel R. Mycotoxins. *JAMA* 2002; 287: 425-427.
23. Guzmán de Peña D. La exposición a la aflatoxina B<sub>1</sub> en animales de laboratorio y su significado en la Salud pública. *Salud Pub Méx* 2007; 49 (3): 227-235.
24. Ito Y, Peterson SW, Wicklow DT, Goto T. *Aspergillus pseudotamari*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *flavi*. *Mycol Res* 2001; 105:233-239.
25. Kurtzman CP, Horn BW. *Aspergillus homius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus taman*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1987;53: 147-158.
26. Task Force Report. Mycotoxins and human disease. En: Cast, ed. *Mycotoxins: Risks in plant, animal and human systems*. Counc Agricul Sci Tech 2003; 139.
27. Groopman JD, Kensler TW. Role of metabolism and viruses in aflatoxin-induced liver cancer. *Toxicol Appl Pharm* 2005; 206: 131-137.
28. Gong Y, Egal S, Hounsa A, Turner P, Hall A, Cardwel K, et al. Determinants of aflatoxin exposure in young children from Benin and Togo, West Africa: the critical role of weaning. *Int J Epidemiol* 2003; 32: 556-562.
29. Valko M, Leibfriz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39 :44-84.

30. Morrisey PA, O'Brien NM. Dietary antioxidants in health and disease. *Int Dairy J* 1998; 8: 463-472.
31. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49: 481-493.
32. Halliwell B. Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr Rev* 1997; 55: 544-552.
33. Cruz PJG. Efectos de la inclusión de aceite de pescado sobre el estado antioxidante en plasma de gallinas de postura (tesis de licenciatura). México: UNAM, 2010.
34. Bergendi L, Benes L, Durackova Z, Ferencik M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 1999; 65: 1865-1874.
35. Mascher GD, Paredes CMC. Radicales libres y sistemas antioxidantes. En: McKee T, McKee JR. *Bioquímica. Las bases moleculares de la vida*. 4ª ed. México: McGraw-Hill, 2009:629-641.
36. Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem & Biophys* 1990; 280: 1-8.
37. Chaudière J, Ferrari-Iliou R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol* 1999; 37: 949-962.
38. Harris ED. Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J* 1992; 6: 2675-2683.
39. Mondola P, Bifulco M, Seru R, Annella T, Ciriolo MR, Santillo M. Presence of CuZn superoxide dismutase in human serum lipoproteins. *FEBS Letters* 2000; 467: 57-60.
40. Martínez AE. Estrés oxidativo en el hígado de rata con síndrome metabólico: participación de la mitocondria. (tesis de maestría). D.F, México: UNAM, 2006.
41. Bandyopadhyay u, Das D, Banerjee RK. Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Curr Sci* 1999; 77: 658-666.

42. Terán FR. El estrés y las interacciones entre los sistemas Nervioso Central e Inmune (tesis de licenciatura). México: UNAM, 2001.
43. Shen D, Dalton TP, Nebert DW, Shertzer HG. Glutathione redox state regulates mitochondrial reactive oxygen production. *J Biol Chem* 280:25305-25312.
44. Masella R, Di Benedetto E, Vari R, Filesì C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 2005, 16:577-586.
45. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* 2003; 333: 19-39.
46. Ceballos AF, Wittwer PA, Contreras A. Actividad sanguínea de glutatión peroxidasa en rebaños lecheros a pastoreo: variación según edad y época del año. *Arch Med Vet* 1998; 30: 13-22.
47. López-Alonso M, Miranda M, Hernández J, Castillo C, Benedito JL. Glutatión peroxidasa (GSH-Px) en las patologías asociadas a deficiencias de selenio en rumiantes. *Arch Med Vet* 1997; 29: 171-180.
48. Arthur JR. The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 1825-1835.
49. Allan CB, Lacourciere GM, Stadtman TC. Responsive Ness of selenoproteins to dietary selenium. *Ann Rev Nutr* 1999; 19: 1-16.
50. Holben DH, Smith AM. The diverse role of selenium within selenoproteins: a review. *J Am Diet Assoc* 1999; 99: 836-843.
51. Wang X, Quinn PJ. Vitamin E and its function in membranes. *Progress Lipid Res* 1999; 38: 309-336.
52. Holum JR. Fundamentos de Química general, orgánica y bioquímica para Ciencias de la Salud. México: Ed. Limusa, 2001.

53. Murray RK, Granner DG, Mayes PA, Rodwell VW. Bioquímica de Harper. 13ª ed. México: El Manual Moderno, 1994.
54. Powers SK, Lennon SL. Analysis of celular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. Proc Nutr Soc 1999; 58: 1025-1033.
55. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? J Lab Clin Med 1992; 119: 598-620.
56. Sordillo LM, Aitken SL. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. Vet Immunol Immunopat 2009; 128: 104-109.
57. Castillo C, Hernández J, Bravo A, Lopez-Alonso M, Pereira V, Benedito JL. Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. Vet J 2005; 169: 286-292.
58. Bernabucci U, Ronchi B, Lancetera N, Nardone A. Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. J Dairy Sci 2005; 88: 2017-2026.
59. Gutteridge JM. The use of standards for Malonyldialdehyde. Anal Biochem 1975; 69: 518-526.
60. Bird RP, Drapes HH. Comparative studies on different methods of Malonaldehyde determination. Methods Enzymol 1984; 105: 299-305.
61. Hoyland DV, Taylor AJ. A review of the methodology of the 2-Thiobarbituric Acid Test. Food Chem 1991; 40: 271-291.
62. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. Free Radic Biol Med 1990; 9: 515-540.
63. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. Anal Biochem 1979; 95: 351-358.

64. Botsoglou NA, Fletouris DJ, Papageorgiou JE, Vassilopoulos VN, Mantis AJ, Trakatellis AG. Rapid, sensitive and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff samples. *J Agric Food Chem* 1994; 42: 1931-1937.
65. Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Anal Biochem* 1996; 239: 70-76.
66. Benzie IFF, Strain JJ. Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified versión for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Method Enzym* 1999; 299: 15-27.
67. Gliszczynska-Swiglo A. Antioxidant activity of wáter soluble vitamins in the TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) and the FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) assays. *Food Chem* 2006; 96: 131-136.
68. Berker KI, Güçlü K, Tor I, Apak R. Comparative evaluation of Fe (III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP) and ferricyanide reagents. *Talanta* 2007; 72 (3): 1157-1165.
69. Firuzi O, Lacanna A, Petrucci R, Marrosu G, Saso L. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by "Ferric Reducing Antioxidant Power" assay and cyclic voltammetry. *BBA* 2005; 1721 (1-3): 174-184.
70. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat-liver. *Biochem Biophys Res Comm* 1976; 71 (4): 952.
71. Flohè L, Günzler W. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984; 105: 114-121.
72. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-169.

73. Clifford AA. Total nutrition: Feeding animals for health and growth. Nottingham, RU: Nottingham Univ Press, 2001.
74. Gómez GB, Escobar a. Neuroanatomía del estrés. Rev Mex Neuroc 2002; 3 (5):273-282.
75. Cannon WB. Stresses and strains of homeostasis. Amer J Med Sci 1935; 189: 1-14.
76. Sapolsky RM. Why zebras don't get ulcers, an updated guide to stress, stress related diseases and coping. New York, USA: Freeman and Company, 1998.
77. Nelson RJ. An Introduction to Behavioral Endocrinology. Sinauer Assoc; 2000: 557-591.
78. Selye H. A síndrome produced by diverse nocuous agents. Nature 1936; 138:32-33.
79. Selye H. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. J Clin Endocrinol 1946; 6: 117
80. Mormède P, Andanson S, Aupèrin B, Beerda B, Guémené D, Malmkvist *et al.* Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. Physiol Behav 2007; 92: 317-339.
81. Gutiérrez OJ. Establecimiento de un modelo de estrés crónico en roedor. Variaciones conductuales y endocrinas (tesis de licenciatura). México: UNAM, 2009.
82. Díaz-Cruz A, Guinzberg R, Gerra R, Vilchis M, Carrasco D, García-Vázquez F, Piña E. Adrenaline stimulates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in liver via NADPH oxidase. Free Radical Research 2008; 41: 663-672.
83. Tresguerres JAF. Fisiología humana. Tercera ed. España: McGraw Hill, 2008.
84. Jáuregui MTI. Efecto de una zona de seguridad en un exhibidor de bisontes americanos (*Bison bison*) en el Zoológico de Chapultepec,

sobre su comportamiento social y estrés (tesis de licenciatura). México: UNAM, 2010.

85. Johansson A. Daily and seasonal rhythms of melatonin, cortisol, leptin, free fatty acids and glycerol in goats. Department of Basic Veterinary Sciences Faculty of Veterinary Medicine. Finland: University of Helsinki, 2008.
86. Bastias CSC. Efecto de diferentes grados de claudicaciones sobre algunos constituyentes sanguíneos indicadores de estrés en vacas lecheras. Valdivia, Chile: Univ Austral de Chile, 2006.
87. McMahon M, Gerich J, Rizza R. Effects of glucocorticoids on carbohydrate metabolism. *Diabetes Metab Rev* 1988; 4:17-30.
88. Friend TH. Behavioural aspects of stress. *J Dairy Sci*, 1991; 74: 292-303.
89. Hasegawa N, Nishiwaki A, Sugawara K, Ito I. The effects of social Exchange between two groups of lactating primiparous heifers on milk production, dominance order, behaviour and adrenocortical response. *Appl Anim Behav*, 1997; 51: 15-27.
90. González VM, Yabuta AK, Galindo F. Behaviour and adrenal activity of first parturition and multiparous cows under a competitive situation. *Appl Anim Behav Sci* 2003; 83: 259-266.
91. Mason G and Mendl M. Why there is not simple way of measuring animal welfare? *Animal Welfare*, 1993; 2: 310-319.
92. Lay DC, Friend TH, Randel RD, Jenkins OC, Nevendorff DA, Kapp GM, Bushong DM. Adrenocorticotrophic hormone dose response and some physiological effects of transportation on pregnant Brahman cattle. *J Anim Sci*, 1996; 74: 1806-1811.
93. Kindahl H, Kornmatitsuk B, Königsson K, Gustafsson H. Endocrine changes in late bovine pregnancy with special emphasis on fetal well-being. *Dom Anim Endocrinol*, 2002; 23: 321-328.

94. Müller C, Palme R, Menke Ch, Waiblinger S. Individual differences in behaviour and in adrenocortical activity in beef-suckler cows. *Appl Anim Behav Sci*, 2003; 84 (3): 167-183.
95. González-de-la-Vara M, Valdez RA, Lemus-Ramírez V, Vázquez-Chagoyán JC, Villa-Godoy A, Romano MC. Effects of ACTH challenge and age on hair cortisol concentrations in dairy cattle. *Canadian J Vet Research*, in Prensa.
96. Guazdauskas FC, Keys Jr JE, McGilliard ML. Adrenal response during periparturient period to adrenocorticotropin in dairy cattle fed corn silage and grass legume silage. *J Dairy Sci*, 1986; 69: 2134-2139.
97. Lay Jr DC, Friend TH, Bowers CL, Grissom KK, Jenkins OC. A comparative physiological and behavioral study of freeze and hot-iron branding using dairy cows. *J Anim Sci* 1992; 70: 1121-1125.
98. Hafez ESE, Hafez B. Reproducción e Inseminación Artificial en animales. 7° ed. México: McGraw-Hill Interamericana, 2002.
99. Bartolomé JA. Endocrinología y fisiología de la gestación y el parto en el bovino. Argentina: Universidad Nacional de la Pampa, 2009. Available from: [www.produccion-animal.com.ar/información\\_tecnica/cria\\_parto/05-parto\\_fisio.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/información_tecnica/cria_parto/05-parto_fisio.pdf)
100. Olivera M, Ferrugem MJC. Gestación. En: Galina C, Valencia J, compiladores. Reproducción en animales domésticos. 3° ed. México: Limusa, 2008.
101. Negro JA, Porcionato AM, De Pasillé, Rushen. Cortisol in saliva and plasma of cattle after ACTH administration and milking. *J Dairy Sci*, 2004; 8:1713-1718.
102. Wagonner JW, Löest CA, Turner JL, Mathis CP, Hallford DM. Effects of dietary protein and bacterial lipopolysaccharide infusion on nitrogen metabolism and hormonal responses of growing beef steers. *J Anim Sci*, 2009; 87: 3656-3668.

103. Drackley JK, Dann HM, Douglas GN, Janovick GNA, Litherland NB, Underwood JP, Looor JJ. Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. *Ital J Anim Sci*, 2005; 4: 323-344.
104. Clapés S. Diabetes mellitus, estrés oxidativo y embarazo. *Rev Cubana Invest Biomed*, 2000; 19 (3): 191-195.
105. Instituto Nacional para el Federalismo y Desarrollo Municipal, Gobierno del Estado de Michoacán, 2009. Available from: <http://sanjoaquinro.gob.mx/work/templates/enciclo/michoacan/mpios/16051a.htm>
106. Forrajera 19 hermanos. Available from: [www.19hnos.com](http://www.19hnos.com)
107. Hopster H. Coping strategies in dairy cows (PhD thesis). Wageningen, The Netherlands: University of Wageningen, 1998.
108. Stat-View McIntosh (computer program), 1996.
109. Passi S, Stancato A and Cocchi M. A monitoring of oxidative stress of ageing and ageing-related diseases. *Prog Nutr*, 2001; 3:35-58.
110. Bell AW. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J Anim Sci*, 1995; 73: 2804-2819.
111. Ingvarsten KL, Andersen JB. Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. *J Dairy Sci*, 2000; 83: 1573-1597.
112. Drackley JK. Transition cow management and periparturient metabolic disorders. In: Kaske M, Scholz H, Höltershinken M Edit. *Recent Developments and Perspectives in Bovine Medicine*. Klinik für Rinderkrankheiten. Tierärztliche Hochschule, Hannover; 2002: 224-235.
113. Greenfield RB, Cecava MJ, Johnson TR, Donkin SS. Impact of dietary protein amount and rumen undegradability on intake, peripartum liver triglyceride, plasma metabolites and milk production in transition dairy cattle. *J Dairy Sci*, 2000; 83: 703-710.

114. Mudron P, Rehage J, Qualmann K, Sallman HP, Scholz H. A study of lipid peroxidation and vitamin E in dairy cows with hepatic insufficiency. *Zentral Veterinarmed*, 1999; Reihe A (46): 219-224.
115. Wachter CM, McDaniel BT, Whitlow LW, Pettyjohn S. Genetics of antioxidant activity in Holsteins and Jerseys: association with various traits. *J Dairy Sci*, 1999; 82 (1): 31.
116. Harmon RJ, Lu M, Trammel DS, Smith BA. Influence of heat stress and calving on antioxidant activity in bovine blood. *J Dairy Sci*, 1997; 80 (1): 264.
117. Calamari L, Maianti MG, Amendola F, Lombardi G. On some aspects of the oxidative status and on antioxidants in blood of dairy cows during summer. 13<sup>th</sup> Associazione Scientifica Produzioni Animali Congress; 1999; Piacenza, Italy: 449-451.
118. Armstrong D, Browne R. The analysis of free radicals., lipid peroxides, antioxidants enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. *Adv Exp Med Biol*, 1994; 366: 43-58.
119. Perkins A. Endogenous anti-oxidants in pregnancy and preeclampsia. *Austral N Zeal J Obstet Gynaecol*, 2006; 46 (2): 77-83.
120. Walsh SW, Wang Y. Secretion of Lipid peroxides by the human placenta. *Am J Obst Gynecol*, 1993<sup>a</sup>; 169: 1462-1466.
121. Deleve LD, Kaplowitz N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol Ther*, 1991; 52: 287-305.
122. Mannervik M. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, 1985; 113: 490-496.
123. Ursini F, Maiorino R, Bringelius-Flohe R, Aumann KD, Roveri A, Schomburg D, Flohe L. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol*, 1995; 252: 38.

124. Suzuki T, Agar NS, Suzuki M. Red cell metabolism: A comparative study of some mammalian species. *Comp Biochem Physio B*, 1984; 79: 515-520.
125. Harrison RO, Young JW, Ford SP. Relationships between cortisol concentration and milk production energy balance and exhibition of estrus during early lactation in Holstein cows. *J Dairy Sci*, 1989; 72: 312-317.
126. Lefcourt AM, Bitman J, Kahl S, Wood LD. Circadian and ultradian rhythms of peripheral cortisol concentrations in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 1993; 76: 2607-2612.
127. Bøe, K.E., Færevik, G. Grouping and social preferences in calves, heifers and cows. *Appl. Anim. Behav. Sci*, 2003; 80:175-190.
128. Flint APF, Rickets AP, Craig VA. The control of placental steroid synthesis at parturition in domestic animals. *Anim. Reprod. Sci* 1979; 2: 239-251.
129. Kirschbaum C, Tietze A, Skoluda N, Dettenborn L. Hair as a retrospective calendar of cortisol production-increased cortisol incorporation into hair in the third trimester of pregnancy. *Psyneuen* 2008; 34: 32-37.
130. Hemsworth PH, Barnett JL, Tilbrook AJ and Hansen C. The effects of handling by human at calving and during milking on the behaviour and milk cortisol concentrations of primiparous dairy cows. *Applied Anim. Behav. Sci*, 1989; 22: 313-326.
131. Raussi SA, Boissy S, Delval E, Pradel P, Veissier I. Does repeated regrouping alter the social behaviour of heifers? *Appl. Anim. Behav. Sci*, 2006; 93: 1-12.
132. Rushen J, Munksgaard L, Marnet PG, Pasillé AM. Human contact and the effects of acute stress on cows at milking. *Appl Anim Behav. Sci*, 2001; 73: 1-14.

133. Hopster H, Bruckmaier RM, Van der Werf JT, Korte SM, Macuhov, Kore-Bouws G, Van Reenen CG. Stress responses during milking; comparing conventional and automatic milking in primiparous dairy cows. *J. Dairy Sci*, 2002; 12: 3206-3216.
134. Raussi S. Group management of young dairy cattle in relation to animal behaviour and welfare (Doctoral dissertation). Helsinki, Finland: Helsinki University, MTT Agrifud Research Finland, 2005.
135. Dimri U, Ranjan R, Sharma MC, Varshney VP. Effect of vitamin E and selenium supplementation on oxidative stress indices and cortisol level in blood in water buffaloes during pregnancy and early postpartum period. *Trop Anim Health Prod*, 2010; 42: 405-410.