

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**VARIACIONES CRONOBIOLOGICAS DE PARAMETROS SANGUINEOS EN
BOVINOS**

AUTORA: Médico Veterinario, M.Sc. María Cristina Scaglione

DIRECTOR: Dr. Rafael Lisandro Althaus

CODIRECTOR: Dr. Juan Carlos Boggio

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

A Raúl, Clorinda y Catalina

AGRADECIMIENTOS

Muchas han sido las personas que de manera directa o indirecta me han ayudado en la realización de esta tesis. Quiero dejar constancia de todas ellas y agradecerles con sinceridad su participación.

He de expresar mi profundo agradecimiento al Dr. Rafael Althaus, por su pertinente dirección, sabios consejos, y su infinita paciencia hacia este trabajo. Muchas gracias por su amistad, por todo su tiempo invertido en la dirección y la corrección de esta tesis, por sus palabras de ánimos y por haber creído en mí desde el inicio hasta el final de mi doctorado

Quiero agradecer al Dr. Juan Carlos Boggio, Codirector de este proyecto, por todo su apoyo, ánimo, amistad, tiempo y conocimientos brindados durante todo el tiempo que duró este trabajo.

A la Universidad Nacional del Litoral, por la beca otorgada y por el subsidio al proyecto titulado “VARIACIONES CRONOBIOLOGICAS DE PARAMETROS SANGUINEOS EN BOVINOS” en el marco de el Curso de Acción para la Investigación el Desarrollo (CAI + D 20002), a través de lo cual hizo posible concretar la presente tesis doctoral.

Agradezco a las autoridades de la Facultad de Ciencias Veterinarias, de la Universidad Nacional del Litoral, en la que actualmente me desempeño como profesora, quienes de una u otra manera han contribuido a la realización de este trabajo.

Mi más hondo agradecimiento y reconocimiento, a las autoridades de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral por brindarme la oportunidad de desarrollar mi doctorado en la misma.

A el Laboratorio Wiener por haber apoyado este proyecto con la donación de reactivos para la realización de las determinaciones sanguíneas.

Estos agradecimientos no se encontrarían completos si no doy una nota de gracias profundas a mis colegas, pasantes, becarios y amigos Eduardo, Diego, Raúl, Silvia, María Fernanda, Dalila, Andrés C., Andrés, F., Miriam, Augusto, Hugo, Beatriz, Nancy, Gerardo, Silvina, Santos y Roberto por su incondicional apoyo en la fase experimental y su colaboración en los días y noches de muestreo a la intemperie, fríos, calurosos, lluviosos y por que no agradables.

Deseo agradecer especialmente a D. Osvaldo Cerutti, por abrirme desinteresadamente las tranqueras de su establecimiento, brindarme los animales para que sean la base de este trabajo y por el apoyo incondicional que va mucho mas allá de la indudable generosidad económica dispensada.

Extiendo mis agradecimientos a mi familia quienes siempre han estado apoyándome en la finalización de este arduo trabajo.

Quisiera rendir con todo mi cariño un profundo agradecimiento a Raúl Delmar Cerutti, mi compañero y esposo, por haber sido una continua guía y luz a lo largo de todos estos años. Esta tesis te la debo a ti en gran parte. Cuántas cosas me has enseñado y como me has llenado la vida durante todos estos años. Muchas gracias por toda tu comprensión y muchas gracias por ocupar un lugar muy importante en mi vida.

Finalmente agradezco y dedico esta tesis a dos destellos de mi corazón, Clorinda y Catalina, quienes acompañan, permiten y disfrutan nuestros días con inocencia y alegría continua.

A todas y cada una de las personas que de una u otra forma me permitieron llevar a cabo esta memoria de título, vayan mis más sinceros agradecimientos.

INDICE GENERAL

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

I.1. Cronobiología	1
I.1.1. Introducción	1
I.1.2. Ritmos biológicos	2
I.1.2.1. Tipos de ritmos biológicos	2
I.1.2.2. Parámetros del ritmo	3
I.1.2.3. Características de los ritmos biológicos	5
I.1.2.3.1. Carácter endógeno de los ritmos biológicos	5
I.1.2.3.2. Sincronización por ciclos ambientales.	6
I.1.2.3.3. Ritmos de curso libre	8
I.1.2.3.4. Factores enmascaradores de los ritmos	8
I.1.2.3.5. Relaciones temporales en el medio interno	9
I.1.2.3.6. Características de los ritmos circadianos	10
I.1.3. Metodología y análisis de fenómenos rítmicos	11
I.1.3.1. Aspectos metodológicos de la cronobiología	11
I.1.3.2. Análisis matemático y estadístico de los ritmos biológicos	15
I.1.3.2.1. Método del cosinor para el análisis de los ritmos circadianos	15
I.1.3.2.2. Análisis de Fourier	19
I.1.4. Ritmos en mamíferos	22
I.1.4.1. Ritmos en hematología	24
I.1.4.2. Ritmos en variables bioquímicas sanguíneas	27
I.1.4.3. Ritmos en la temperatura corporal	28
I.1.5. Implicaciones de la cronobiología en medicina	31

I.2. Variables sanguíneas	32
I.2.1. Variables hematológicas:	32
1.2.1.1 Eritrograma	34
1.2.1.2 Leucograma	37
1.2.1.3. Plaquetas	43
I.2.2. Variables bioquímicas	43
I.2.2.1. Electrolito	43
I.2.2.1.1. Calcio	44
I.2.2.1.2. Fósforo	47
I.2.2.1.3. Magnesio	48
I.2.2.1.4. Sodio	49
I.2.2.1.5. Potasio	50
I.2.2.2. Metabolitos del suero	50
I.2.2.2.1. Glucosa	51
I.2.2.2.2. Colesterol	53
I.2.2.2.3. Triglicéridos	54
I.2.2.2.4. Bilirrubina total	55
I.2.2.3 Componentes nitrogenados	55
I.2.2.3.1. Proteínas Total	56
I.2.2.3.2. Albúminas	58
I.2.2.3.3. Urea	59
I.2.2.3.4. Creatinina	60
I.2.2.4. Enzimas séricas	61
I.2.2.4.1. Aspartato aminotransferasa (AST)	64
I.2.2.4.2. Alanino aminotransferasa (ALT)	65
I.2.2.4.3. Fosfatasa alcalina (ALP)	65
I.2.2.4.4. Amilasa	66

I.3. Temperatura corporal	66
CAPÍTULO II. OBJETIVOS DEL TRABAJO	70
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS	74
III.1. Lugar de trabajo y animales	74
III.2. Condiciones del muestreo	75
III.3. Materiales y equipos analíticos	77
III.3.1. Materiales en la toma de muestra	77
III.3.2. Equipos analíticos	77
III.4. Métodos de análisis estadístico	82
III.4.1. Análisis de la varianza con mediciones repetidas	82
III.4.2. Ajuste a series de temporales	83
III.4.3. Análisis Cluster	84
III.4.3.1. Generalidades del Análisis Cluster	84
III.4.3.2. Asociación de los ritmos biológicos por Análisis Cluster	86
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	88
IV.1. Variables hematológicas	88
IV.2. Electrolitos séricos	103
IV.3. Metabolitos séricos	124
IV.4. Componentes nitrogenados	132
IV.5. Enzimas séricas	149
IV.6. Temperatura corporal	166
IV.7. Asociación del comportamiento rítmico de las variables sanguíneas mediante análisis cluster	172
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	176
CAPÍTULO VI. RESUMEN	178

SUMMARY	180
CAPÍTULO VII. BIBLIOGRAFÍA	182

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Valores de parámetros rítmicos de la temperatura corporal en bovinos.	30
Tabla 2.	Valores de referencia de electrolitos plasmáticos para bovinos adultos.	44
Tabla 3.	Valores de referencia de variables bioquímicas séricas para bovinos adultos.	51
Tabla 4.	Valores de referencia de componentes nitrogenados del suero para bovinos adultos.	56
Tabla 5.	Valores de referencia de enzimas séricas para bovinos adultos.	63
Tabla 6.	Utilización para el diagnóstico diferencial de las determinaciones de actividad enzimática en el suero bovino.	64
Tabla 7.	Energía perdida en bovinos en pastoreo y en bovinos confinados.	69
Tabla 8.	Horario meridional y su respectivo HALO para cada muestreo en las diferentes estaciones.	76
Tabla 9.	Temperatura ambiente (°C) y humedad relativa registrada en la localidad de Villa Trinidad en el período 2002-2003.	76
Tabla 10.	Resultados del ANOVA que expresan los efectos de la categoría de bovinos, estación y HALO sobre las variables hematológicas.	88
Tabla 11.	Principales parámetros estadísticos de las variables hematológicas para diferentes categorías de bovinos y estaciones del año.	90
Tabla 12.	Parámetros estadísticos que expresan los modelos rítmicos diarios de los niveles de eritrocitos en sangre de bovinos Holstein.	91
Tabla 13.	Parámetros estadísticos que expresan los modelos rítmicos diarios de los niveles de hemoglobina en sangre de bovinos Holstein.	91
Tabla 14.	Parámetros estadísticos que expresan los modelos rítmicos diarios de los valores de hematocrito en sangre de bovinos	92

	Holstein.	
Tabla 15.	Valores medios de los períodos de los ritmos de eritrocitos, hemoglobina y hematocrito en sangre de bovinos Holstein.	96
Tabla 16.	Resultados del ANOVA que expresan los efectos de la categoría de bovinos, estación y HALO sobre concentraciones de iones en suero.	103
Tabla 17.	Principales parámetros estadísticos de las concentraciones de iones en suero para diferentes categorías de bovinos y estaciones del año.	104
Tabla 18.	Parámetros estadísticos que expresan los modelos rítmicos diarios de los niveles de calcio sérico de bovinos Holstein.	106
Tabla 19.	Modelos rítmicos diarios determinados mediante un ajuste no lineal de una función coseno que representan las variaciones temporales de los niveles de magnesio sérico de bovinos Holstein.	112
Tabla 20.	Valores medios de los períodos de los ritmos de magnesio sérico de bovinos Holstein.	112
Tabla 21.	Modelo rítmico diario determinado mediante un ajuste no lineal de una función coseno que representa la variación temporal de los niveles de sodio sérico de bovinos Holstein.	116
Tabla 22.	Modelo rítmico diario determinado mediante un ajuste no lineal de una función coseno que representa la variación temporal de los niveles de potasio sérico de bovinos Holstein.	121
Tabla 23.	Resultados del ANOVA que expresan los efectos de la categoría de bovinos, estación y HALO las variables bioquímicas.	124
Tabla 24.	Principales parámetros estadísticos de las variables bioquímicas sanguíneas para diferentes categorías de bovinos y estaciones del año.	125
Tabla 25.	Parámetros estadísticos que expresan los modelos rítmicos diarios de los niveles de glucosa sérica de bovinos Holstein.	126
Tabla 26.	Resultados del Análisis de la Varianza para evaluar los efectos de la categoría de bovinos, estación y HALO sobre	132

componentes nitrogenados del suero.

Tabla 27.	Principales parámetros estadísticos de las concentraciones de los componentes nitrogenados del suero para diferentes categorías de bovinos y estaciones del año.	133
Tabla 28.	Modelos rítmicos diarios determinados mediante un ajuste no lineal de una función coseno que representan las variaciones temporales de los niveles séricos de proteínas totales de bovinos Holstein.	134
Tabla 29.	Valores medios de los períodos de los ritmos de proteínas totales en sangre de bovinos Holstein.	136
Tabla 30.	Modelos rítmicos diarios determinados mediante un ajuste no lineal de una función coseno que representan las variaciones temporales de los niveles séricos de albúmina de bovinos Holstein.	139
Tabla 31.	Valores medios de los períodos de los ritmos de albúminas en sangre de bovinos Holstein.	139
Tabla 32.	Modelos rítmicos diarios determinados mediante un ajuste no lineal de una función coseno que representan las variaciones temporales de los niveles de creatinina sérica de bovinos Holstein.	145
Tabla 33.	Valores medios de los períodos de los ritmos de albúminas en sangre de bovinos Holstein.	145
Tabla 34.	Resultados del Análisis de la Varianza para evaluar los efectos de la categoría de bovinos, estación y HALO sobre las variables en la actividad enzimática.	149
Tabla 35.	Principales parámetros estadísticos de las concentraciones de las variables enzimáticas del suero para diferentes categorías de bovinos y estaciones del año.	150
Tabla 36.	Modelos rítmicos diarios determinados mediante un ajuste no lineal de una función coseno que representan las variaciones temporales de los niveles séricos de AST de bovinos Holstein.	152
Tabla 37.	Valores medios de los períodos de los ritmos de AST en sangre de bovinos Holstein.	154
Tabla 38.	Modelos rítmicos diarios determinados mediante un ajuste no	156

lineal de una función coseno que representan las variaciones temporales de los niveles de ALT séricos de bovinos Holstein.

Tabla 39.	Valores medios de los períodos de los ritmos de ALT en sangre de bovinos Holstein.	157
Tabla 40.	Modelos rítmicos diarios determinados mediante un ajuste no lineal de una función coseno que representan las variaciones temporales de los niveles séricos de ALP de bovinos Holstein.	160
Tabla 41.	Modelos rítmicos diarios determinados mediante un ajuste no lineal de una función coseno que representan las variaciones temporales de los niveles de amilasa sérica de bovinos Holstein.	163
Tabla 42.	Principales parámetros estadísticos de la temperatura rectal para diferentes categorías de bovinos y estaciones del año.	167
Tabla 43.	Modelos rítmicos diarios determinados mediante un ajuste no lineal de una función coseno que representan las variaciones temporales de la temperatura rectal de bovinos Holstein.	168

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Representación gráfica de los parámetros característicos de un ritmo, utilizando el ajuste de la serie temporal a una función cosenoidal. Están representados los puntos correspondientes a los valores de la serie junto con la función ajustada.	16
Figura 2.	Representación polar de la acrofase y la amplitud estimadas mediante el método cosenoidal junto a la elipse de confianza para un 95%. El área negra indica el período de oscuridad, el área gris marca la zona de transición del periodo luz-oscuridad entre las estaciones.	18
Figura 3.	Variaciones diarias de la concentración eritrocitaria en las diferentes estaciones, para diferentes categorías de bovinos Holstein.	93
Figura 4.	Variaciones diarias de la concentración de hemoglobina en las diferentes estaciones, para diferentes categorías de bovinos Holstein.	94
Figura 5.	Variaciones diarias del hematocrito en las diferentes estaciones, para diferentes categorías de bovinos Holstein.	95
Figura 6.	Representación polar de las elipses con un intervalo de confianza del 95 % para las variaciones rítmicas de las acrofases y las amplitudes de la concentración eritrocitaria en las distintas estaciones para diferentes categorías en bovinos Holstein.	99
Figura 7.	Representación polar de las elipses con un intervalo de confianza del 95 % para las variaciones rítmicas de las acrofases y las amplitudes de la concentración de hemoglobina en las distintas estaciones para diferentes categorías de bovinos Holstein.	100
Figura 8.	Representación polar de las elipses con un intervalo de confianza del 95 % para las variaciones rítmicas de las acrofases y las amplitudes del hematocrito en las distintas estaciones para diferentes categorías de bovinos Holstein.	101
Figura 9.	Variaciones diarias de la concentración sérica de calcio de bovinos Holstein en las diferentes estaciones.	107
Figura 10.	Representación polar de las elipses con un intervalo de confianza del 95 % para las variaciones rítmicas de las	109

acrofases y las amplitudes de la concentración de calcio sérico en las distintas estaciones.

Figura 11.	Variaciones diarias de la concentración sérica de magnesio en las diferentes estaciones, para diferentes categorías de bovinos Holstein.	113
Figura 12.	Representación polar de las elipses con un intervalo de confianza del 95 % para las variaciones rítmicas de las acrofases y las amplitudes de la concentración sérica de magnesio en las distintas estaciones para diferentes categorías de bovinos Holstein.	115
Figura 13.	Variaciones diarias de la concentración sérica de sodio de bovinos Holstein en las diferentes estaciones.	117
Figura 14.	Representación polar de las elipses con un intervalo de confianza del 95 % para las variaciones rítmicas de las acrofases y las amplitudes de la concentración sérica de sodio en las distintas estaciones.	120
Figura 15.	Variaciones diarias de la concentración sérica de potasio de bovinos Holstein.	121
Figura 16.	Representación polar de las elipses con un intervalo de confianza del 95 % para las variaciones rítmicas de las acrofases y las amplitudes de la concentración sérica de potasio en bovinos Holstein.	122
Figura 17.	Variaciones diarias de la concentración sérica de glucosa de bovinos Holstein en las diferentes estaciones.	128
Figura 18.	Representación polar de las elipses con un intervalo de confianza del 95 % para las variaciones rítmicas de las acrofases y las amplitudes de la concentración sérica de glucosa en las distintas estaciones en bovinos Holstein.	129
Figura 19.	Variaciones diarias de la concentración sérica de proteínas totales en las diferentes estaciones, para diferentes categorías de bovinos Holstein.	135
Figura 20.	Representación polar de las elipses con un intervalo de confianza del 95 % para las variaciones rítmicas de las acrofases y las amplitudes de la concentración sérica de proteínas totales en las distintas estaciones para diferentes categorías de bovinos Holstein.	137

Figura 21.	Variaciones diarias de la concentración sérica de albúmina en las diferentes estaciones, para diferentes categorías de bovinos Holstein.	140
Figura 22.	Representación polar de las elipses con un intervalo de confianza del 95 % para las variaciones rítmicas de las acrofases y las amplitudes de la concentración sérica de la albúmina en las distintas estaciones para diferentes categorías de bovinos Holstein.	142
Figura 23.	Variaciones diarias de la concentración sérica de creatinina en las diferentes estaciones, para diferentes categorías de bovinos Holstein.	146
Figura 24.	Representación polar de las elipses con un intervalo de confianza del 95 % para las variaciones rítmicas de las acrofases y las amplitudes de la concentración sérica de creatinina en las distintas estaciones para diferentes categorías de bovinos Holstein.	147
Figura 25.	Variaciones diarias de la concentración sérica de AST en las diferentes estaciones, para diferentes categorías de bovinos Holstein.	153
Figura 26.	Representación polar de las elipses con un intervalo de confianza del 95 % para las variaciones rítmicas de las acrofases y las amplitudes de la concentración sérica de AST en las distintas estaciones para diferentes categorías de bovinos Holstein.	155
Figura 27.	Variaciones diarias de la concentración sérica de ALT en las diferentes estaciones, para diferentes categorías de bovinos Holstein.	158
Figura 28.	Representación polar de las elipses con un intervalo de confianza del 95 % para las variaciones rítmicas de las acrofases y las amplitudes de la concentración sérica de ALT en las distintas estaciones para diferentes categorías de bovinos Holstein.	159
Figura 29.	Variaciones diarias de la concentración sérica de ALP para diferentes categorías de bovinos Holstein.	161
Figura 30.	Representación polar de las elipses con un intervalo de confianza del 95 % para las variaciones rítmicas de las acrofases y las amplitudes de la concentración sérica de ALP en las distintas estaciones en bovinos Holstein.	162

Figura 31.	Variaciones diarias de la concentración sérica de amilasa de bovinos Holstein en las diferentes estaciones.	164
Figura 32.	Representación polar de las elipses con un intervalo de confianza del 95 % para las variaciones rítmicas de las acrofases y las amplitudes de la concentración sérica de amilasa en las distintas estaciones en bovinos Holstein.	165
Figura 33.	Variaciones diarias de la temperatura rectal de bovinos Holstein en las diferentes estaciones.	169
Figura 34.	Representación polar de las elipses con un intervalo de confianza del 95 % para las variaciones rítmicas de las acrofases y las amplitudes de la temperatura rectal en las distintas estaciones en bovinos Holstein..	171
Figura 35.	Asociaciones de los componentes sanguíneos que manifestaron ritmos diarios en las diferentes categorías bovinas.	174

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Φ	Acrofase
A_0	MESOR
A_1	Amplitud
ALP	Fosfatasa alcalina
GB	Glóbulos blancos (leucocitos)
AST	Aspartato aminotransferasa
ALT	Alanina aminotransferasa
GR	Glóbulos rojos (eritrocitos)
HALO	Hours after light onset
Hb	Hemoglobina
Hto	Hematocrito
t	Tiempo
T	Período
W	Frecuencia angular

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

I.1. Cronobiología

I.1.1. Introducción

Desde tiempos remotos, los organismos vivos conviven con procesos rítmicos en el ambiente. Las interacciones de la tierra con el sol y la luna, aliadas a la inclinación natural de su eje, tienen como resultado los ciclos asociados al día y a la noche, a las estaciones del año, a las fases de la luna y a la oscilación de las mareas (Rotenberg y col., 1997).

Las múltiples actividades biológicas de los seres vivos no se manifiestan de manera constante. Por el contrario, varían de forma periódica, regular y predecible. Actualmente se admite que la ritmicidad es una propiedad fundamental de todos los organismos, desde los unicelulares hasta los pluricelulares más complejos en todos los niveles de organización, desde el subcelular hasta el sistema orgánico en su totalidad (Reinberg, 1979a).

Los ritmos biológicos son de origen genético (Hardin y col., 1990; Young, 1992), y característicos de cada especie animal, aunque pueden observarse acusadas variaciones interindividuales. Estos ritmos se ven influenciados o condicionados por factores externos ambientales, o por hábitos de vida, denominados sincronizadores (Steimbach y col., 1976; Reinberg, 1979a). Así, el reloj biológico puede ser ajustado por diferentes estímulos ambientales, desde el ciclo luz-oscuridad hasta cambios en la temperatura, el consumo de alimentos o la presión parcial de oxígeno (Costas y col., 1989).

La cronobiología (Reinberg, 1982) se refiere al estudio sistemático de las características temporales de la materia viva, incluye el análisis de ritmos biológicos como, por ejemplo, las oscilaciones periódicas en variables biológicas y los cambios asociados al desarrollo.

I.1.2. Ritmos biológicos

Un ciclo consiste en la sucesión de acontecimientos que tienen lugar de forma repetitiva, siempre en el mismo orden, sin tener en cuenta el tiempo en que se producen, cuando ocurre en un intervalo de tiempo constante y previsible se habla de ritmo (Diez-Noguera, 2002). Por ello, un ritmo biológico es la recurrencia de un fenómeno biológico en intervalos regulares de tiempo (Kalmus, 1935, citado en Aschoff, 1981).

Los animales, las plantas, y probablemente todos los organismos muestran algún tipo de variación rítmica fisiológica (tasa metabólica, producción de calor, floración, etc.) que suele estar asociada con un cambio ambiental rítmico (Pittendrigh y Minis, 1964; Reinberg y Smolensky, 1993).

Los ritmos biológicos no constituyen un fenómeno casual ni un seguimiento pasivo de las condiciones ambientales, sino que forman parte de una adaptación al entorno que es fundamental para la supervivencia de las especies (Gruart, 2002).

La existencia de variaciones rítmicas en las funciones fisiológicas, que no reaccionan sino que anticipan las perturbaciones predecibles, ha conducido a una segunda definición del término homeostasis. Son homeostáticas no sólo las estrategias que permiten al organismo una respuesta apropiada ante cambios en el medio ambiente (“homeostasis reactiva”), sino también las respuestas periódicas (ritmos biológicos) que permiten al organismo predecir el momento de probable aparición de los estímulos ambientales y así iniciar de antemano la corrección adecuada (homeostasis predictiva) (Moore-Ede, 1986).

I.1.2.1. Tipos de ritmos biológicos

Según Reinberg y Smolensky (1993), los ritmos biológicos se clasifican teniendo en cuenta su período principal o bien su frecuencia (inversa del período) en:

-Ritmos circadianos: caracterizados por presentar una frecuencia próxima a la diaria, tienen un período comprendido entre 16 y 32 h (Reinberg y Halberg, 1971). Son

los más estudiados desde el punto de vista biológico y médico. Entre ellos cabe citar el ciclo sueño-vigilia, los ritmos de la mayoría de las hormonas o la incidencia de infartos de miocardio y hemorragias cerebrales (Reinberg, 1982; Cardoniga, 1990).

-Ritmos ultradianos: tienen una frecuencia superior a la diaria, algunos autores consideran que su período es inferior a 20 h. Son muy abundantes, aunque no han sido muy bien estudiados en parte debidos a que no se sincronizan a ningún factor ambiental periódico. Entre ellos tenemos los ciclos de sueño REM-nREM, el latido cardíaco, la ventilación pulmonar y los pulsos de la hormona de crecimiento, hormona luteinizante y hormona estimulante del folículo, (Golombek, 2002).

-Ritmos infradianos: presentan una frecuencia inferior a la diaria, es decir, con un período superior a las 28 h. Dentro de ellos existen varias categorías de acuerdo con el ciclo ambiental al que se sincronizan. Numerosos autores como Reinberg (1982), Cadorniga (1990) y Boggio (1993), los clasifican en:

- Circaseptanos, con un período de una semana.
- Circalunares, de 28 días de período.
- Circanuales, con un período de 365 días.

El ciclo menstrual, o los ciclos de aparición de la gripe son ejemplos de esta categoría.

No es infrecuente que una misma variable biológica presente de forma simultánea ritmos de frecuencia diferente; así, la actividad cardiaca se manifiesta según ritmos donde los períodos son de alrededor de un segundo, de alrededor de 24 horas, o de alrededor de un año (Bingham y col., 1984).

I.1.2.2. Parámetros del ritmo

Los ritmos biológicos pueden representarse gráficamente para su mejor interpretación. Según lo establecen Halberg y col. (1977); Haus y col. (1988) y Reinberg (1992), la función periódica más utilizada para ello es la cosenoidal, a partir

de la cual pueden determinarse una serie de parámetros como el nivel medio o MESOR (A_0), la amplitud (A_1), la fase o acrofase (Φ) y el período (T).

I.1.2.2.1. MESOR

Acrónimo de “Midline Estimating Statistic Of Rhythm”. Es el valor medio de una función rítmica (curva coseno) ajustada a los datos de una serie temporal; normalmente es el punto medio entre los picos y valles de la curva coseno (Halberg y col., 1977).

I.1.2.2.2. Amplitud

Se define como la mitad de la variabilidad total del ritmo por el período considerado, o como la mitad del cambio predecible que se produce en un ciclo estimado mediante una función (sinusoidal u otra). En una curva coseno ideal es la distancia que hay desde el pico de la curva hasta el MESOR. El cambio total predecible es la doble amplitud (Halberg y col., 1977).

I.1.2.2.3. Fase o Acrofase

Medida de tiempo transcurrido entre un instante (fase) de referencia y la fase donde es mayor la probabilidad de ser encontrado el valor más elevado de una variable, a partir de una curva senoidal ajustada a los datos (Golombek, 2002).

Según Halberg y col. (1977), la acrofase se expresa en unidades de tiempo (horas, minutos, segundos, etc.), ángulo o episodio fisiológico (número de latidos cardíacos por ejemplo).

La referencia puede ser arbitraria, como por ejemplo la hora 00:00 del día de inicio de estudio, externa como el comienzo de la fase de la luz de un ciclo

luz/oscuridad o también interna, como la acrofase de otro ritmo biológico con la misma frecuencia en el mismo organismo (Diez-Noguera, 2002).

Se debe usar siempre el valor de la acrofase seguido del intervalo de confianza, como por ejemplo $18:15 \pm 0:30$ para la acrofase de la temperatura central humana (Haus y col., 1988).

I.1.2.2.4. Período.

Duración de un evento, en cronobiología se utiliza para identificar la duración de un ciclo. Se usa la letra T para identificar ciclos impuestos a un determinado ciclo biológico (Diez-Noguera, 2002).

I.1.2.3. Características de los ritmos biológicos

I.1.2.3.1. Carácter endógeno de los ritmos biológicos

Los ritmos son evidentes en la mayoría de los seres vivos con períodos que van desde fracciones de segundo hasta años. Estos ritmos persisten en condiciones de laboratorio, aún sin las señales temporales, es decir, son de carácter endógenos (Aschoff, 1981a).

Se considera que los relojes biológicos representan el funcionamiento de programas temporales incrustados en el genoma, los cuales son el resultado de la adaptación de los organismos a un entorno físico que presenta variaciones cíclicas originadas por los movimientos de rotación y traslación de la tierra y la luna alrededor del sol (Gruart y col., 2002).

Los relojes sirven para medir con gran precisión el tiempo, tanto geográfico como biológico, a fin de programar las diversas funciones y actividades de los organismos, para mantener su precisión en cualquier latitud y época del año (Gruart y col., 2002).

La endogeneidad de los ritmos proporciona a la especie una capacidad anticipadora, que le permite organizar recursos y actividades antes de que sean necesarios (Pittendrigh, 1960).

De este modo, las transiciones entre estados, como del sueño a la vigilia o del ayuno a la alimentación, se preparan progresivamente antes que el individuo se despierte o se alimente. La preparación para la vigilia en humanos, por ejemplo, implica la liberación de hormonas, como el cortisol, y la elevación de la temperatura interna en las últimas etapas del sueño (Czeisler y col., 1980).

Además de la anticipación, la adaptación temporal consiste en la armonización de las fases de los ritmos de la especie con aquellas de los ciclos ambientales. Esto implica que los estados de los ritmos fisiológicos y de comportamiento están asociados a las fases más propicias del ciclo ambiental para la supervivencia de la especie. Esta armonización de fases se alcanza a través de la sincronización, en que el ritmo en libre curso, generado por el oscilador interno, tiene su fase y frecuencia ajustadas por uno o más factores cíclicos del ambiente (Pittendrigh, 1981).

I.1.2.3.2. Sincronización por ciclos ambientales

Todos los animales, las plantas, y probablemente todos los seres vivos muestran algún tipo de variación rítmica fisiológica (nivel de cortisol, producción de calor, floración y muchos otros) que suele estar asociada con un cambio ambiental rítmico (Pittendrigh y Minis, 1964; Reinberg y Smolensky, 1993).

La sincronización se refiere al proceso de ajuste temporal de organismos a ciclos ambientales, como por ejemplo la sincronización de ritmo de la temperatura central a la luz/oscuridad ambientales (Marques y col., 1997).

Como consecuencia de la sincronización se establece y mantiene una relación de fase estable entre el sincronizador y el ritmo endógeno y se asegura la correspondencia del tiempo biológico con el geológico (Aguilar-Roblero, 1993).

El fenómeno de sincronización, en general, puede solamente efectuarse dentro de un rango de períodos, cercanos al período natural de sistema sincronizado (Pitterndrigh y Bruce, 1959).

La estabilidad en la duración del período está íntimamente relacionada con señales del ambiente que dependen de los ciclos geofísicos, como la salida y puesta del sol, la duración del día y la noche, las fases de la luna, las mareas, los cambios de humedad, temperatura y la presión atmosférica que caracterizan a las estaciones del año, o la combinación de algunos de estos fenómenos. Tales señales ambientales permiten que cada día, mes o año, se ajuste el período y la fase del ritmo biológico que se trate, fenómeno que se llama sincronización (Gruart y col., 2002).

Halberg y col. (1977) establecen que el cambio cíclico ambiental que es capaz de sincronizar un ritmo endógeno se le denomina "Zeitgeber" (que significa "dador de tiempo"). Según la evolución temporal del sincronizador, la duración de los ciclos será diferente (Costas y col., 1989).

Desde la aparición de la vida en la Tierra hace unos 4.500 millones de años, ésta ha dado unas 1,5 billones de vueltas. Eso por sí solo justifica que los organismos hayan ajustado el período de sus oscilaciones al ciclo diario ambiental más importante que es la alternancia día/noche.

El sincronizador ambiental más poderoso, tanto para los animales como para las plantas, es el ciclo luz-oscuridad, al que se suman, en los mamíferos, otros factores sociales y ambientales. Zeitgeber secundarios, como la disponibilidad de alimentos, ruido, actividad motora o temperatura afectan significativamente a los ciclos circadianos en muchas circunstancias (Steimbach y col., 1976; Reinberg, 1979a).

Otros fenómenos geofísicos que se han propuesto también como sincronizadores son el magnetismo terrestre, las radiaciones cósmicas y los campos electromagnéticos débiles (Moore-Ede, 1986).

Sin la sincronización, el individuo no podría ajustar sus funciones a los cambios que ocurren en el ambiente, como aquellos en la duración del día durante el año, o los que dependen de la localización geográfica del individuo (Moore-Ede, 1986).

I.1.2.3.3. Ritmos de curso libre

El mantener los ritmos en ambiente constante demuestra el carácter endógeno de la ritmicidad biológica (Gruart y col., 2002).

En condiciones constantes de laboratorio, diversos ritmos biológicos continúan expresándose durante días, meses o años, dependiendo de la especie y de las condiciones experimentales. Estos ritmos son conocidos como ritmos en libre curso y son la expresión de relojes biológicos endógenos (Gruart y col., 2002).

En condiciones de libre curso, el período se vuelve ligeramente diferente de aquel exhibido en condiciones naturales, desviándose del valor preciso del ciclo ambiental. De allí viene la denominación “circa” adoptada para ritmos de diferentes frecuencias, como los circadianos, circalunares, circamareales y circanuales (Marques y col., 1997).

El ritmo en libre curso se caracteriza por su período, período de libre curso, representado por la letra τ (tau). El valor de tau es característico de una especie, sin embargo muestra variaciones interespecíficas e interindividuales, como fue demostrado en cuatro especies de roedores nocturnos por Daan y Pittendrigh (1976).

I.1.2.3.4. Factores enmascaradores de los ritmos

Los factores ambientales pueden tener, sin embargo, una acción directa sobre el ritmo expresado, modificándolo, sin que se involucre al reloj biológico. A este fenómeno Aschoff (1960) lo llamó enmascaramiento y explica que se trataba de “condiciones experimentales que podrían ocultar el verdadero Zeitgeber”.

Folkard (1989) plantea el enmascaramiento definitivamente como un problema, considerado como un gran obstáculo para determinar el modo de acción y la expresión del sistema temporizador endógeno.

Mrosovsky (1994) considera al enmascaramiento como parte del sistema circadiano, colocándolo, por ello, en términos de importancia junto a la sincronización.

La posibilidad de responder directamente a un estímulo ambiental, sin que necesariamente este estímulo sea un ciclo, proporciona al organismo una flexibilidad que no le es permitida en los mecanismos rígidos de la sincronización y otorga al enmascaramiento un papel importante en la adaptación temporal: el de agente de la plasticidad (Page, 1989).

El hecho que cada especie responda a un determinado agente enmascarador de manera característica y constante (Marques y Waterhouse, 1994) puede ser una indicación de que el enmascaramiento está actuando junto al Zeitgeber, proporcionando un refinamiento y una aceleración del ajuste del organismo al ambiente.

I.1.2.3.5. Relaciones temporales en el medio interno

La regulación entre los diferentes sistemas de un organismo depende no sólo de elementos espaciales sino también de una temporización apropiada. Su organización, que resulta en un conjunto armónico, depende de la separación espacial de los diferentes pasos y de una secuencia temporal entre ellos. Según Marques y col. (1997), la secuencia temporal entre los ritmos biológicos se denomina orden temporal interno (OTI).

El patrón rítmico del medio interno de un organismo no depende de la presencia de un Zeitgeber. Existen evidencias de la existencia de un mecanismo interno de acoplamiento entre los ritmos circadianos (Czeisler, 1978) y que el mantenimiento del orden temporal interno no depende de señales ambientales.

En el medio interno, cada sistema u órgano muestra un modelo rítmico, perfectamente caracterizado, de acuerdo con ciertos parámetros, como frecuencia, amplitud y acrofase. Los patrones rítmicos de las variables son ajustados entre sí, manteniendo ángulos de fase específicos entre ellos (Moore- Ede y col., 1976).

Estas relaciones de fases son típicas de cada especie y, como sería de esperar, tienen patrones opuestos, en especies diurnas y nocturnas, con relación al Zeitgeber LO. El patrón rítmico del medio interno de la especie es el factor determinante para que la especie sea activa durante el día o no. Sin duda este patrón rítmico interno ha sido establecido a lo largo de la evolución del organismo en su hábitat (Moore- Ede y col., 1976).

I.1.2.3.6. Características de los ritmos circadianos

Los más estudiados son los ritmos circadianos, en los que el período equivale al tiempo que tarda la tierra en una rotación completa (alrededor de 24 horas). Su valor de período les permite sincronizar a los ritmos ambientales que posean un período de 24 h, como son los ciclos de luz y de temperatura (Cadorniga, 1990).

Los ritmos endógenos circadianos, establecen una fase estable con los ciclos externos alargando o acortando su valor de período e igualándolo al del ciclo ambiental.

Poseen las siguientes características (Reinberg y Halberg, 1971, Pittendrigh, 1972; Aschoff, 1981a):

a) Son endógenos, persisten durante generaciones sin la presencia de claves temporales.

b) En condiciones constantes se presenta una oscilación espontánea con un período que podrá apartarse de las 24 h, pero oscilará entre las 16 y 32 horas. Son circadianos, etimológicamente de *circa*=alrededor y *diem*=día.c) La longitud del período en oscilación espontánea se puede modificar ligeramente al variar la temperatura, es decir, poseen mecanismos de compensación de temperatura.

d) Son susceptibles de sincronizar a los ritmos ambientales que posean un valor de período de 24 h, como los ciclos de luz y de temperatura.

e) La ritmicidad puede dejarse de expresar bajo ciertas condiciones ambientales como luz brillante.

f) En oscilación libre o espontánea, generalmente el período para especies diurnas es mayor de 24 h y para especies nocturnas el período es menor a las 24 h (Ley de Aschoff).

El sistema circadiano no está completamente presente en el momento del nacimiento de un individuo sino que, se desarrolla durante el período postnatal (Haus y Touitou, 1992). En el momento del nacimiento, la mayoría de los animales presentan ritmos ultradianos en la mayor parte de sus variables. La maduración de los ritmos representa un cambio de ritmicidad de ultradiana a circadiana. Posteriormente, el ritmo circadiano aumenta su amplitud hasta alcanzar un valor propio de la edad madura, aunque la maduración también puede comportar modificaciones en el período, la forma, el patrón del ritmo circadiano, así como la sincronización con ciclos externos. En la maduración de los ritmos existen una serie de influencias procedentes de la madre que ya empiezan en la etapa fetal, y del ambiente, como son la luz y el acceso a la comida. Las características de los ritmos circadianos se mantienen a lo largo de la vida adulta. No obstante, en la vejez, se producen una serie de cambios como son un acortamiento el período, una disminución de la amplitud del ritmo circadiano, la aparición de un ritmo ultradiano y una desincronización interna.

I.1.3. Metodología y análisis de fenómenos rítmicos

I.1.3.1. Aspectos metodológicos de la cronobiología

La cronobiología ha sido definida como la ciencia que cuantifica e investiga mecanismos de estructuras temporales biológicas (Halberg, y col., 1977) y la inclusión del tiempo como un factor primordial en las investigaciones cronobiológicas constituye la principal diferencia en relación a estudios clásicos de biología.

Observar a la materia viva en función del tiempo significa una comprensión de los fenómenos biológicos e implica una nueva lectura del análisis e interpretación de los resultados de un experimento (Moreno y col., 1997).

La incorporación del tiempo como una variable que puede alterar la expresión cuantitativa y cualitativa de la mayoría de los procesos biológicos, añade una nueva dimensión a la biología que enriquece y permite mejorar la comprensión del funcionamiento de los organismos (Moreno y col., 1997).

En la literatura científica contemporánea, se percibe una tendencia a valorar cada vez más una lectura dinámica de los fenómenos biológicos. A modo de ejemplo se puede considerar las modificaciones de comportamiento de los sistemas y las oscilaciones que pasan a ser objeto de estudio en sí, dejando de ser fluctuaciones para pasar a ser controladas (Moreno y col., 1997).

Desde el punto de vista cronobiológico, las condiciones fisiológicas y etológicas de un organismo vivo cambian a medida que el tiempo transcurre, además de verse modificados al pasar de un hemisferio a otro, recorriendo de esta manera, una secuencia de estados que se repiten periódicamente (Halberg y Halberg, 1980).

Para comprender la variación estacional en la dinámica de los ecosistemas es necesario observar la influencia de la luz sobre los organismos, la cual debe ser considerada como un factor ecológico de fundamental importancia (Figala y Tester, 1990).

En los experimentos cronobiológicos, algunos momentos del ciclo del sincronizador, como por ejemplo el comienzo de la fase de luz, deben ser determinados de forma de actuar como referencia temporal. De esta forma, la determinación de la acrofase de un ritmo puede basarse en algún horario local (medianoche, mediodía). Halberg y Simpson (1967) propusieron el medio período de sueño como una alternativa; Menna Barreto y col. (1993) sugieren el medio período de trabajo en las investigaciones con trabajadores por turnos alterados. La utilización de una referencia temporal hace

posible la comparación de acrofases entre individuos de poblaciones sometidas a esquemas temporales diferentes.

La medición de la duración de las fases de luz oscuridad es fundamental para el desencadenamiento de la respuesta fotoperiódica y también para la regulación de los ritmos diarios. La extensión de la noche se evalúa a partir de una señal humoral dada por la hormona melatonina (Arendt, 1995).

Al planificar un experimento de investigación de la presencia simultánea de ritmos estacionales y circadianos, las series temporales deberán ser suficientemente largas para englobar todas las estaciones del año dos o tres veces y, al mismo tiempo, el intervalo de recolección en cada época del año deberá ser tal que permita la verificación de la existencia de un ritmo circadiano (Amélia y Silva, 1993).

El desarrollo de una metodología cronobiológica exige establecer formas de recolección de datos. Esto significa, elegir el instrumental de recolección, la frecuencia y el tipo de muestreo. El instrumental de recolección es decisivo al detallar el protocolo. Por ejemplo, en caso que se desee detectar frecuencias ultradianas de temperatura central en una rata, es indispensable tener un termómetro suficientemente sensible como para medir pequeñas variaciones de temperatura en cortos intervalos de tiempo (Minors y Waterhouse, 1989).

En lo referente a la tasa de muestreo, ella debe ser como mínimo, de acuerdo con el teorema del muestro (Amélia y Silva, 1993), dos veces mayor que la frecuencia del ritmo estudiado, que en el caso de circadiano corresponde a dos medidas cada 24 horas. Sin embargo, los problemas de un muestreo tan poco frecuente son evidentes pues, si los dos puntos de medidas coinciden con puntos en el que el ritmo pasa por el valor medio, ningún ritmo será detectado y, además, aún existiendo una diferencia estadística entre las dos medidas, no se tiene informaciones sobre el valor de los extremos de la oscilación, ni sobre el momento en que la variable pasa por su valor máximo (o mínimo), datos indispensables en una investigación cronobiológica.

La tasa de muestreo mínima depende mucho de la variable que se está investigando y de los objetivos de los experimentos. En general, cuando se sabe poco sobre la forma de onda de la variable, se deben medir por lo menos 6 puntos por el ciclo (Minors y Waterhouse, 1989). Si se necesita una mejor caracterización del ritmo, es necesaria una tasa de muestreo aún más alta. Si no es posible una tasa alta de muestreo a lo largo de todo el ciclo, conviene hacer más medidas cuando las fluctuaciones son más rápidas y menos medidas cuando los cambios son más lentos.

En lo que refiere al tipo de muestreo, una recolección de datos puede hacerse a través de un muestreo longitudinal o transversal. El muestreo longitudinal es preferible en el caso en que se desee estudiar el ritmo de un sujeto: en caso de una investigación circadiana, conviene que la duración total del experimento sea superior a 6 días y el intervalo entre medidas sea aproximadamente 4 horas. El muestreo transversal es adecuado en el estudio del ritmo de pequeños grupos: datos de 6 o más sujetos deben ser tomados cada 4 horas durante 24 horas como mínimo, en el caso de ritmos circadianos (Minors y Waterhouse, 1989).

En el análisis de datos cronobiológicos se aplican además de los métodos utilizados en estadística, preferentemente aquellos métodos de análisis de series temporales. El análisis matemático y estadístico de fenómenos periódicos ha interesado a físicos y economistas, especialmente en lo que se refiere a la teoría de transmisión de calor, astronomía y proyecciones de modelos matemáticos, como es discutido por Shumway (1988). Con respecto a las ciencias Biológicas, estos análisis sólo se produjeron en las últimas décadas (Halberg y col., 1977; Reinberg, 1974) y el motivo de este atraso puede atribuirse a la ausencia de registros de larga duración.

El análisis cronobiológico de series temporales abarca el estudio descriptivo y la detección de periodicidades. El análisis matemático de las series de tiempo sirve para determinar, en primer lugar, si existe o no un fenómeno periódico. En caso afirmativo, el análisis se utiliza para describir las características del ritmo y para comparar dichas características entre distintos grupos experimentales (Minors y Waterhouse, 1989).

Cuando se estudian diversas funciones en un mismo organismo, a los objetivos anteriores podríamos agregarle la determinación de las posibles relaciones de fase entre las distintas funciones orgánicas; es decir, elaborar el mapa temporal de las funciones de dicho organismo. Por su parte, cuando se trata de ritmos sincronizados, conviene determinar las relaciones de fase entre las funciones orgánicas y el ciclo ambiental de que se trate (Gruart y col., 2002).

I.1.3.2. Análisis matemático y estadístico de los ritmos biológicos

I.1.3.2.1. Método del cosinor para el análisis de los ritmos circadianos

El método de cosinor consiste en ajustar los datos experimentales a una función cosenoidal y realizar posteriormente una representación gráfica (Haus y Touitou, 1992; Díez-Noguera, 2002). Esto obedece al hecho que, cuando se analiza un ritmo circadiano del que no se conoce su naturaleza, el modelo matemático más adecuado es el correspondiente a una función cosenoidal.

En el análisis matemático de los ritmos se utiliza una serie de parámetros: MESOR o medida ajustada al ritmo que representa el valor intermedio entre el valor mas alto y el mas bajo del ritmo ajustado a una función matemática, generalmente cosenoidal (Figura 1). Se utiliza debido a que la media aritmética simple no representa la media del ritmo ya que puede estar sesgada por la diferente densidad de muestreo. En el modelo cosenoidal, el MESOR será igual a la media aritmética de los datos sólo si éstos se han recogido a intervalos regulares a lo largo de todo el ciclo del ritmo (Díez-Noguera, 1998).

La amplitud se define como la mitad de la distancia entre el punto más alto y el mas bajo del modelo matemático. Una vez aplicado el modelo matemático apropiado, la situación del ritmo en el tiempo define la acrofase por el punto más alto y la batifase por el punto mas bajo en referencia a una relación escogida por el investigador. El tiempo transcurrido entre la referencia y la fase se conoce como ángulo de fase y se expresa en unidades de tiempo o en grados angulares (un período = 360°) en sentido horario. Así,

se pueden observar avances o retrasos de fase en un ciclo de diferentes parámetros medidos en diferentes circunstancias (Cugini y col., 1988, Díez-Noguera, 2002).

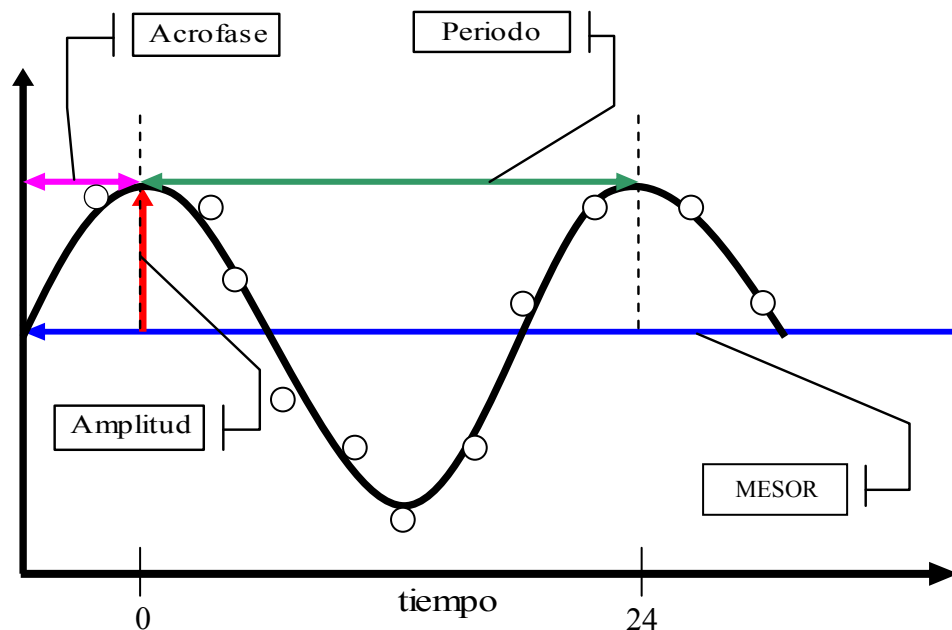


Figura 1. Representación gráfica de los parámetros característicos de un ritmo, utilizando el ajuste de la serie temporal a una función cosenoidal. Están representados los puntos correspondientes a los valores de la serie junto con la función ajustada.

El ajuste de datos a una función cosenoidal se expresa matemáticamente de la siguiente forma:

$$Y(t) = A_0 + A_1 \cdot \cos(w \cdot t + \Phi)$$

Donde “t” es la variable tiempo, “Y (t)” es el valor de la variable en el tiempo, “A₀” es el valor medio de la función (MESOR), “A₁” es la amplitud de la oscilación, “w” representa la frecuencia y “Φ” la acrofase.

En éste método, M recibe el nombre de MESOR (Midline Estimated Statistics Of Rhythm) y φ recibe el nombre de acrofase (fase mas alta).

El procedimiento matemático consiste en hallar los valores de A_0 , A_1 , y ϕ que hacen que la función cosenoidal se ajuste lo máximo posible a los valores experimentales de la variable $Y(t)$ (Haus y Touitou, 1992).

Se puede aplicar a cualquier serie de datos siempre y cuando se conozca el período del ritmo que se está analizando; no es necesario que el muestreo sea regular, aunque es recomendable que se obtengan datos a lo largo de todo el ciclo (Cornélissen y col., 1980).

Los valores de amplitud y acrofase se representan en forma de vector sobre un círculo horario en el que una vuelta representa un intervalo de tiempo equivalente al período de ajuste de la función, generalmente 24 h (Figura 2).

El origen del vector se encuentra en el centro del círculo, la longitud del vector es proporcional a la amplitud del ritmo y cuyo extremo apunta a la hora del día correspondiente a la acrofase: el vector apunta el momento del ciclo en que la función ajustada tiene su valor máximo (Cugini y col., 1988).

El vector se halla incluido dentro de una elipse de confianza que es la región en la cual se encontrará el extremo del vector con un 95% de probabilidad. Las tangentes a la elipse, trazadas a partir del centro del círculo, delimitan un intervalo de tiempo que es el intervalo de confianza de la acrofase (Halberg, 1969).

Una elipse que cubra el origen del vector indica que el ritmo no es estadísticamente significativo ya que cabe la posibilidad de que existan vectores con amplitud cero (Diez-Noguera, 2002).

También se suele representar una elipse que engloba el extremo del vector y que indica la región en la que se encuentra el extremo del vector con un 95% de probabilidad. Esta elipse permite determinar los límites de confianza de la amplitud y de la acrofase (Cugini y col., 1988).

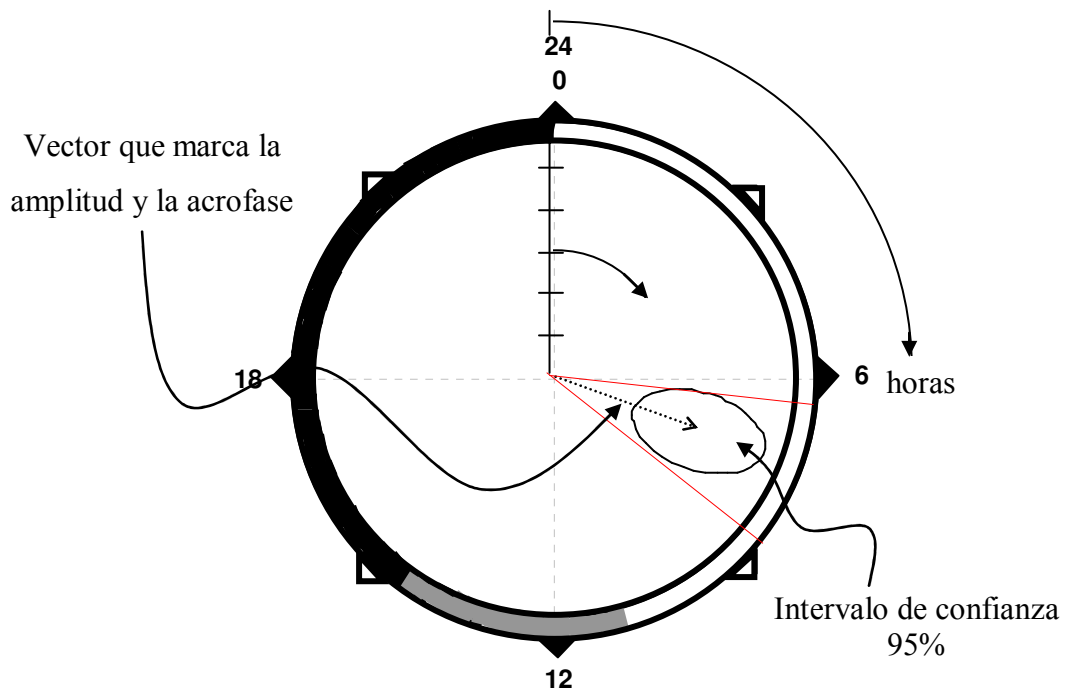


Figura 2. Representación polar de la acrofase y la amplitud estimadas mediante el método cosenoidal junto a la elipse de confianza para un 95%. El área negra indica el período de oscuridad, el área gris marca la zona de transición del período luz-oscuridad entre las estaciones.

En un mismo círculo horario se pueden representar vectores y elipses de confianza que correspondan a serie de datos diferentes. Esto permite comparar las características rítmicas de las dos series, por ejemplo de animales en condiciones experimentales diferentes. Para determinar si los ritmos son significativamente diferente basta con analizar si las elipses de confianza están superpuestas o no. En el caso de que no estén superpuestas, sería imposible encontrar un vector que explique simultáneamente las características rítmicas de las dos series por lo que se podría afirmar que los ritmos presentan diferencias estadísticas entre ellos. En el caso de existir superposición, total o parcial, de las elipses, los vectores no son diferentes entre sí (Halberg, 1969).

En el caso de encontrar diferencias significativas entre los dos ritmos, se puede calcular si la diferencia radica en la amplitud, la acrofase, o en ambos parámetros. Una

vez ajustada la serie de datos a una función cosenoidal, se pueden restar a los valores de una nueva serie de datos para calcular la varianza residual que es aquella no explicada por el cosinor y que no debería ser superior al 40 % de la varianza total. No obstante, es frecuente que en los registros de presión arterial, el cosinor explique sólo un 40 % de la varianza total del sistema (Diez-Noguera, 1998)

Otro aspecto del análisis de cosinor es el llamado cosinor poblacional, que sirve para representar las características rítmicas de una población de individuos. En este caso, el vector que se representa en el círculo horario es la media de los vectores individuales, y la elipse de confianza viene determinada por la nube de puntos delimitados por los extremos de los vectores individuales. Al igual que en el análisis de cosinor individual, en el análisis poblacional se pueden comparar los ritmos de poblaciones diferentes (Halberg, 1969).

En lo que se refiere a las desventajas, como no toda serie temporal tiene forma de coseno, no siempre es conveniente aplicar el Cosinor. Además, el método exige que los errores residuales sean independientes, tengan distribución normal, con promedio cero y varianza igual en todos los puntos de medida, ya que realiza una transformación lineal y un simple ajuste por mínimos cuadrados (Diez-Noguera, 2002)

I.1.3.2.2. Análisis de Fourier

En muchas series temporales es frecuente que el cosinor no explique más de un 40% de la variación total (ello implica una variación residual del 60 %). En estos casos es recomendable utilizar el análisis de Fourier para lograr un mayor ajuste a los datos experimentales (Haus y Touitou, 1992).

El análisis de Fourier se basa en el principio de que toda función periódica se puede descomponer en la suma de infinitas funciones cosenoidales de frecuencias armónicas a la frecuencia fundamental (Haus y Touitou, 1992; Diez-Noguera, 2002).

En este tipo de análisis se trata de ajustar la serie de valores residuales resultantes del análisis de cosinor a una nueva función cosenoidal con otro período. Después de realizar este ajuste, obtendríamos una nueva serie de residuales (cada vez más pequeños), a los que serían ajustados, a su vez, a una función cosenoidal con otro período diferente. Este proceso se podría repetir una y otra vez hasta que la suma de los cuadrados de los residuales (variación residual) se acerque a cero. En este momento la ecuación matemática formada por la suma de todas las funciones cosenoidales calculadas, explicaría prácticamente toda la variación del proceso estudiado (Cugini y col., 1988).

Cada uno de los componentes cosenoidales se denomina un armónico, y se suelen emplear un máximo de seis a ocho armónicos para lograr una buena descripción del proceso. Más allá del décimo armónico resulta muy difícil diferenciar si se trata de un verdadero armónico o simplemente ruido de fondo (Díez- Noguera, 1998).

En el análisis de Fourier cada función cosenoidal viene definida por una amplitud, un desplazamiento de fase y un período específicos. La función $Y(t)$ se puede escribir como la suma de sus armónicos (Haus y Touitou, 1992; Díez-Noguera, 2002).

$$Y(t) = A_0 + A_1 \cos(\omega_1 t + \Phi_1) + A_2 \cos(\omega_2 t + \Phi_2) + \dots + A_i \cos(\omega_i t + \Phi_i)$$

Donde ω_i es la velocidad angular del armónico i , t es la variable tiempo, $Y(t)$ es el valor de la variable en el tiempo t , M es el valor medio de la función, A_i es la amplitud del armónico i Φ es la acrofase.

En caso de hacer el ajuste de series mediante el programa cosinor, se utiliza la forma linealizada, donde las frecuencias se conocen o se fijan de antemano (por ejemplo $\omega_2 = 12$ h; $\omega_3 = 8$ h, etc.)

$$Y = a_1 \cos(\omega_1 * t) + b_1 \text{sen}(\omega_1 * t) + a_2 \cos(\omega_2 * t) + b_2 \text{sen}(\omega_2 * t) + \dots$$

Para determinar la amplitud y la fase de cada armónico se emplean las mismas fórmulas que para el cosinor. De hecho se puede observar claramente que el cosinor no es más que un caso particular del análisis de Fourier, en el que solo se utiliza el primer armónico. De igual forma que el cosinor, se puede determinar el grado de significación estadística de cada armónico, lo que permite establecer el número de armónicos necesarios para realizar el análisis (Diez-Noguera, 2002).

Si los datos han sido registrados de manera uniforme, la cantidad de varianza explicada por cada armónico (potencia del armónico) es igual al cuadrado de su amplitud. La representación gráfica de las potencias de los sucesivos armónicos constituye el espectro de potencias del proceso analizado. La observación del espectro de potencias permite discernir fácilmente la importancia relativa del ritmo circadiano (primer armónico) respecto a otros ritmos como el de 12 u 8 h b78 c87 (segundo y tercer armónicos), en el caso de utilizar el cosinor (Haus y Touitou, 1992).

La aplicación práctica del análisis de Fourier, tiene interés cuando se dispone de registros largos, normalmente cuatro o cinco días, ya que entonces permite calcular la forma de onda “promedio”, eliminando las variaciones accidentales que se producen durante el día, y destacando aquello que se repite diariamente y que constituye el perfil característico del individuo (Cugini y col., 1988).

El espectro de potencias constituye una forma de caracterizar matemáticamente el patrón circadiano de un ritmo, pero para realizar una correcta interpretación conviene recordar que se trata de de un simple instrumento matemático de análisis, y que normalmente no pueden interpretarse las amplitudes de los diferentes armónicos como la manifestación de osciladores internos con sus mismas frecuencias, ya que las frecuencias de los armónicos están limitadas a los múltiplos de la frecuencia fundamental (Cugini y col., 1988).

También hay que tener presente que un espectro de potencia puede ser obtenido a partir de formas de onda diferentes, o lo que es lo mismo, a partir de un mismo

espectro de potencia pueden observarse muchas formas de onda diferentes (teóricamente infinitas). Ello es debido a que en la definición de una forma de onda intervienen dos aspectos de cada armónico: la amplitud y la fase, mientras que en el espectro de potencia sólo depende de las amplitudes (Díez-Noguera, 1998).

La combinación de los mismos armónicos pero variando sus relaciones de fases, da lugar a un conjunto de ondas que se denominan subrogadas y que todas ellas tienen el mismo espectro de potencia. Así pues la utilización de los espectros de potencia para estudiar el grado de semejanza de las formas de onda (o patrones circadianos) de dos ritmos puede demostrar la existencia de diferencias, pero nunca verificar su igualdad (Díez-Noguera, 2002).

El análisis de las potencias de los armónicos mediante la descomposición permite determinar cuáles son los componentes rítmicos más importantes de la serie de datos que se analizan. De la misma manera se puede utilizar para realizar un filtrado de los datos originales, es decir, para eliminar determinadas frecuencias. Así, una vez realizada la descomposición de los datos originales, se puede realizar el proceso inverso eliminando determinadas frecuencias y así volver a la serie original “filtrada” (Haus y Toutou, 1992).

I.1.4. Ritmos en mamíferos

El conocimiento de una organización temporal de animales y plantas ha generado un gran impacto en la agricultura y ganadería, contribuyendo a la estabilización de ecosistemas agrícolas (Figala y Tester, 1990).

Disponer de un reloj biológico interno permite a los organismos que lo poseen adelantarse a determinados acontecimientos cíclicos. De este modo, el organismo estará preparado para aprovechar una determinada situación ambiental desde el primer momento en que se produce (Marques y col, 1977). Por ejemplo, los animales que se reproducen una vez al año, concentrando el período reproductor, aumentan las posibilidades que sus descendientes sobrevivan a la presión de los depredadores.

Además, si las crías nacen en la época del año donde existe una mayor abundancia de alimento, contarán con una ventaja añadida frente a aquellas que nazcan en épocas donde el alimento escasee o los depredadores abundan. De este modo, se seleccionan aquellos animales provistos de relojes biológicos precisos que inducen la reproducción en el momento más favorable para la especie.

El fotoperiodismo permite a los animales de diferentes latitudes adecuarse a las condiciones óptimas del medio de acuerdo con los cambios estacionales del mismo. Estudios realizados en ovejas revelan que los días largos tienen una marcada influencia sobre la estacionalidad del período reproductivo del rebaño (Malpoux y col., 1989).

Se han propuesto diversas teorías como modelos para explicar el fenómeno del fotoperiodismo, sin embargo, está bien fundamentado que la melatonina (N-acetil-5 metoxitriptamina) es el disparador químico fundamental para el reconocimiento de la señal fotoperiódica por el sistema circadiano (Cardinali, 1981).

A pesar de no conocerse completamente la función de la pineal en distintos procesos fisiológicos, se puede afirmar que es el principal mediador de la respuesta fisiológica en los ritmos circanales y un poderoso modulador de los ritmos circadianos (Cardinali, 1981).

La pineal es la principal interface entre el ciclo luz-oscuridad ambiental y el sistema nervioso central y endocrino. La secreción de melatonina es el resultado de la situación de iluminación ambiental (Pevet, 1987).

La aplicación de la cronobiología en el sector ganadero abarca el crecimiento, la reproducción, la producción y la salud del rebaño. Por ello, la realización de investigación en esta área se ve estimulada cada vez más en los últimos años (Figala y Tester, 1990).

En estudios cronobiológicos realizados con el ganado bovino, se reconoce al fotoperíodo como una de las principales variables que regulan los ritmos de reproducción animal. Su manipulación se practica comercialmente desde la década del año 1920 con el propósito de estimular el crecimiento y la reproducción de animales en granjas. También se utiliza como inductor del crecimiento corporal y del aumento de la producción lechera, atribuyéndole a las hormonas de crecimiento, prolactina y melatonina, el papel regulador de estas respuestas (Tucker y Ringer, 1982).

La organización temporal del metabolismo de los animales es fundamental para la producción y se ve influenciada por numerosas funciones y estados fisiológicos, que están sincronizadas con condiciones ambientales. De esta forma, condiciones ambientales desfavorables pueden generar desincronizaciones entre eventos bioquímicos del metabolismo de los animales. Por lo tanto, el estudio de los factores que modulan esas funciones fisiológicas es necesario para aumentar la productividad de los rebaños (Figala y Tester, 1990).

I.1.4.1. Ritmos en hematología

El número de elementos circulantes en la sangre periférica muestra ritmos circadianos en todas las líneas celulares. Los ritmos circadianos de células rojas y de sus parámetros relacionados son de baja amplitud, mientras aquellos de linfocitos circulantes y granulocitos son de alta amplitud y pueden ser de importancia en el diagnóstico (Piccione y Caola, 2002).

Los ritmos circadianos de los elementos sanguíneos son de naturaleza compleja. La distribución entre los compartimientos y otros factores como la liberación desde la médula y el recambio celular pueden estar involucrados. Por consiguiente, la extrapolación del ritmo circadiano desde la sangre periférica a la médula del hueso tiene que realizarse con mucha cautela (Smaaland. y Laerum, 1992).

Muchos autores han destacado la importancia de la cronobiología para el laboratorio hematológico entre los que se destacan Haus y col. (1989) y Smaaland y Laerum (1992).

A partir de la segunda mitad del último siglo, existen nuevas técnicas para contar el número de elementos circulantes en la sangre periférica y se reveló una gran variabilidad en estos elementos, encontrándose que algunas de estas oscilaciones no ocurren al azar, sino que son la expresión de eventos rítmicos que se repiten regularmente (Japha, 1900; Sabin y col., 1927).

Con las mejoras en la exactitud y precisión de los métodos hematológicos de investigación, se estableció que algunas de estas variaciones periódicas, sobre todo las circadianas, son altamente reproducibles y predecibles en el tiempo y, en algunos casos, son suficientemente grandes para ser de interés clínico (Haus, 1992).

Si bien no se encuentran en la literatura referencias sobre ritmos en los parámetros hematológicos en bovinos, diversos estudios han identificado ritmos en otras especies. Ritmos diarios han sido descritos en el equino (Gill y Rastawicka, 1986; Komosa y col., 1990; Yashiki y col., 1995; Piccione y col., 2001a) y en el perro (Piccione y col. 2004). Estas variaciones rítmicas pueden sobreponerse a los ritmos con períodos entre 15 y 30 días (Piccione y col., 2001a) incluyendo los ritmos circavigintan y circatrigintan en el caballo y cerdo (Piccione y col., 1993; Piccione y col., 1998c; Piccione y col., 1998e; Piccione y col., 2001a) y a las variaciones estacionales y circaanuales (Gill y col., 1978; Gill y Kompanowska-Jeziarska., 1985; Gill y col., 1986).

En equinos alimentados con diferentes dietas, se ha detectado la existencia de un ritmo diario con la acrofase durante la noche, en los valores de volumen celular aglomerado, hemoglobina y glóbulos blancos (Gatta y col., 1992; Greppi y col., 1996).

En pollos, Durotoye y col. (2000) observaron variaciones diarias con fases opuestas a lo largo de las 24 horas en glóbulos blancos por un lado y por el otro, en glóbulos rojos, PCV y hemoglobina.

En humanos, el número de glóbulos rojos circulantes, la hemoglobina y el hematocrito muestran un ritmo circadiano ampliamente reproducible (Touitou y col., 1979) y regular pero de baja amplitud, con acrofase en adultos y jóvenes situada alrededor de las 11:00 h y algo más temprano en individuos ancianos (Swoyer y col., 1989).

El ritmo circadiano leucocitario en individuos es altamente reproducible, como ha sido demostrado en diversos estudios (Hermida y col., 1986; Hermida, 1987). La acrofase se encuentra durante la tarde, entre las 21:00 y las 24:00 h, con un cambio significativo en el número leucocitario (Haus y col., 1983).

La variación diaria del número total de glóbulos blancos en humanos, responde a la composición de los ritmos circadianos de los distintos tipos de leucocitos (neutrófilos, linfocitos, etc.) algunos de los cuales muestran diferentes fases a lo largo de las 24 h. Los neutrófilos circulantes manifiestan un ritmo circadiano con acrofase alrededor de las 19:00 h. La variación circadiana en los monocitos circulantes sigue un perfil similar al observado para los neutrófilos, aunque la variabilidad individual es mucho mayor. El ritmo circadiano del número de eosinófilos circulantes presenta su acrofase durante las horas nocturnas, hacia las 02:00 h, con gran variabilidad entre sujetos que conduce a intervalos de referencia excesivamente amplios (Haus y col., 1983).

Los linfocitos circulantes en humanos, presentan un ciclo circadiano muy regular y altamente reproducible a nivel poblacional, en pequeños grupos de sujetos, e incluso a nivel individual. La acrofase de este ritmo circadiano ocurre durante las horas nocturnas, con mayores valores entre la media noche y las 01:00 h. Aunque los ritmos circadianos en el número de linfocitos son de las funciones periódicas más estables y reproducibles, los linfocitos circulantes no constituyen una población homogénea sino que consisten en subtipos funcionales muy diferentes. Algunos de los subtipos muestran

a su vez un ritmo circadiano en su número y/o en su proporción relativa en la población de linfocitos total. En concreto, se han descrito variaciones circadianas en células T y en subconjuntos de células T (Bertouch y col., 1983; Swoyer y col., 1989).

En humanos, el número de plaquetas circulante en la sangre periférica muestra una variación circadiana con valores máximos hacia las 19:00 h. Sin embargo, la variación entre diferentes individuos es tan grande y la variación circadiana en el número de plaquetas es tan pequeña que las diferencias rítmicas circadianas en su rango de referencia son clínicamente irrelevantes para la evaluación de recuentos plaquetarios simples (Haus, 1992).

I.1.4. 2. Ritmos en variables bioquímicas sanguíneas

En química clínica, han sido descritos en el plasma y en los solutos urinarios de los animales domésticos, ritmos circadianos, circaseptan, circavigintan, circatrigintan y circanuales (Piccione y Caola 2002).

En el estudio de parámetros hematoquímicos, se han evaluados eventos rítmicos en el rango de frecuencia ultradiana, circadiana, circatrigintan y circannual en equinos y potros (Piccione, 1993; Piccione y col., 1994a; Piccione y col., 1996c) en vacas y terneros (Panzera y col., 1992; Caola y col., 1993; Piccione y col., 1994b; Piccione y col., 1996a), en ovejas y cabras (Caola y col., 1991; Caola y col., 1992; Piccione y col., 1998a; Piccione y col., 1998b; Piccione y col., 1998d), en cerdos (Piccione y col., 1998e) y conejos (Piccione y col., 1995).

Sólo en algunos parámetros sanguíneos, la amplitud de los ritmos de los solutos es suficientemente grande para ocasionar problemas en el diagnóstico. La edad, sexo, especie, raza, alimento y producción pueden modular los ritmos biológicos en los animales domésticos (Piccione y Caola 2002).

En la sangre, las concentraciones de los iones constituyen parámetros importantes que pueden verse afectadas por el momento del muestreo manifestando, al

igual que otros componentes biológicos, oscilaciones claras en un período de alrededor de 24 h (Bajksy y col., 1999).

Bajksy y col. (1999) detectaron en vacas lecheras en el período de seca y fin de gestación variaciones circadianas en las concentraciones de Ca ionizado. También ritmos en los niveles de calcio y fósforo han sido demostrados en bovinos (Valtorta y col., 2000), en roedores (Egger y col., 1994), en equinos (Greppi y col., 1996; Piccione y col., 2001a), en ovejas (Piccione y col., 1998a) y en conejos (Piccione y col., 1995).

En terneros, los niveles de Ca y P responderían a variaciones cronobiológicas circadianas con la acrofase a las 15:28 h para ambos minerales (Valtorta y col., 2000). En contraste a estos hallazgos, otros autores (Scott y col., 1993), no detectan diferencias significativas en las fluctuaciones diarias de las concentraciones plasmáticas de Ca total en ovejas.

Los estudios realizados en equino, indican que algunas variables presentaron un ritmo circadiano. Así, la concentración de Ca total fluctuó en todo momento, con 2 nadir (14:00 a 16:00 h, y a la medianoche a las 02:00 h) y un pico a las 07:00 h. Las concentraciones de calcio incrementaron en las primeras horas de la mañana, pero a partir de las 17:00 a 23:00 h se mantuvieron constantes (Russel, 1997).

La aplicación futura de los ritmos biológicos en medicina del laboratorio dependerá críticamente de los adelantos en el campo de recolección y análisis de datos (Piccione y Caola 2002).

I.1.4. 3. Ritmos en la temperatura corporal

El conocimiento detallado de la variable rítmica normal de temperatura corporal de animales, resulta fundamental en medicina veterinaria para el procedimiento diagnóstico y la optimización de la producción en la industria lechera y cárnica.

La variación diaria de la temperatura corporal se ve afectada por cambios en la actividad física y en el nivel metabólico de los animales homeotermos (Stanier y col.,

1984) y se sincroniza con las modificaciones diarias de la intensidad lumínica, la temperatura, y quizás con otros factores ambientales (DaSilva y Minomo, 1995).

La ritmicidad de la temperatura corporal, debido a su fácil monitoreo y elevada robustez, ha sido ampliamente utilizada como un indicador de la ritmicidad del reloj biológico (Zulley y col., 1981; Klerman, y col., 2002).

La abundancia relativa de reviews relacionados a ritmos biológicos de la temperatura corporal en los animales domésticos demuestra que el tema es especialmente importante en fisiológica (Mendel. y Raghavan, 1964; Hunsaker y col., 1977; Kanno, 1977; Hertrampf y col., 1978; Greig y McIntyre, 1979; Igono y col., 1983; Bitman y col., 1984; Araki y col., 1985; Hahn, 1987; Recabarren y col., 1987; Mohr y Krzywanek, 1990; Davidson y Fewell, 1993; DaSilva y Minomo, 1995; Macaulay y col., 1995; Mohr y Krzywanek, 1995; Piccione y col., 1998c; Ayo y col., 1999; Lefcourt y col., 1999; Piccione y col., 2000; Piccione y col., 2001b; Piccione y col., 2002; Piccione y col., 2002).

En la Tabla 1, se resumen los resultados de siete estudios concernientes a temperatura corporal en ganado bovino (*Bos taurus*), aunque solamente cuatro de ellos pretenden determinar la presencia de ritmos diarios. La media de la temperatura corporal es relativamente semejante, fluctuando desde 38,6 °C hasta 39,2 °C, excepto en un trabajo (Piccione y col., 2003b) que resulto ser aproximadamente 0,5 °C inferior a la observada por los otros autores. Los valores de la fluctuación diaria de la oscilación van desde 0,8 hasta 1,8 °C.

En el estudio de Lefcourt y col (1999), las oscilaciones en la temperatura corporal fueron de alta frecuencia e impidieron la identificación de ritmos diarios. Cuatro de los trabajos encontraron ritmos diarios de elevada robustez, aunque la acrofase varió desde fines de la tarde (10 horas luego de la salida del sol) hasta la mitad de la noche (16 horas luego de la salida del sol).

El ritmo de la temperatura corporal también ha sido utilizado como instrumento para detectar el estro en vacas lecheras y encontrar enfermedades en este tipo de rebaño (Lefcourt, 1990).

Tabla 1. Valores de parámetros rítmicos de la temperatura corporal en bovinos

Especie	Temperatura media °C	Rango °C	Acrofase (horas luego de la salida del sol)	Referencia
	38,6	1,8	10	Bligh y Harthoorn (1965)
	38,9	--	--	Chesy y col. (1983)
	39,2	--	--	Chesy y col. (1985)
Bovino	39,1	1,2	10	Araki y col. (1987)
	38,8	0,8	16	Hahn y col. (1990)
	38,9	1,0	--	Lefcourt y col. (1999)
	38,3	1,4	10	Piccione y col. (2003b)

En las hembras bovinas, el ciclo estral dura 21 a 25 días e incluye oscilaciones tanto en la actividad motora como en la temperatura corporal (Lewis y Newman, 1984; Redden y col., 1993). En el día del estro se observa un incremento de la temperatura corporal de 0,2 a 0,6 °C (Lewis y Newman, 1984; Kyle y col., 1998), aunque diferentes estudios describen que este incremento dura solamente unas pocas horas (Fordham y col., 1988; Redden y col., 1993; Kyle y col., 1998). La utilización del registro de la temperatura corporal para predecir la ovulación tiene una tasa de detección del 80-87 % y una tasa de falsos positivos de 10-17 % (Fordham y col., 1988; Redden y col., 1993; Kyle y col., 1998).

En el hombre, el pico de actividad adrenérgica que causaría la vasoconstricción periférica y promovería el aumento de la temperatura central ocurre al mediodía o temprano por la tarde, mientras que la mayor sudoración se produce a las 16:00 y 20:00 h (Stephenson y col., 1984). La conductancia termal de muchos mamíferos y pájaros también varía de manera circadiana, siendo superior durante la fase activa que durante

la fase inactiva del día (Aschoff, 1981b), facilitando la pérdida de calor cuando los animales están activos, y la conservación de calor cuando ellos están durmiendo.

I.1.5. Implicaciones de la cronobiología en medicina

La Cronobiología, ciencia que trata del estudio de la organización temporal de los seres vivos (Halberg, 1979), se desarrolla en la actualidad en dos dominios complementarios; por un lado, investigaciones de carácter fundamental relacionadas con el funcionamiento del sistema circadiano (marcapasos, relojes moleculares, sincronización) y por otro, investigación médica relacionada con las alteraciones fisiológicas y patológicas de los ritmos, las modificaciones de los efectos de los medicamentos en función de la hora de administración y las consecuencias terapéuticas de los fenómenos anteriores.

Entre los principales conceptos relacionados con la cronobiología médica cabe citar:

-Cronopatología. Estudia las variaciones periódicas de los signos y síntomas de una enfermedad, tanto a nivel individual como colectivo y de las alteraciones persistentes de la estructura temporal ligados al proceso patológico.

-Cronotoxicología. Estudia las variaciones periódicas de los efectos tóxicos o no deseados de agentes físicos o químicos.

-La Cronotolerancia de un organismo se corresponde a las variaciones periódicas de su resistencia a los efectos tóxicos y/o no deseados de un agente físico o químico.

-Cronofarmacología. Estudia los efectos de los medicamentos en función del tiempo biológico en el que se administran y sobre los parámetros que caracterizan los ritmos biológicos.

-Cronoterapéutica. Estudia la elección del momento óptimo de administración de un agente terapéutico tratando de:

- respetar y restaurar la estructura temporal de un organismo.
- buscar las horas de mayor eficiencia y tolerancia.
- adaptar el tratamiento a las variaciones rítmicas de los síntomas de la enfermedad.

I.2. Variables sanguíneas

El análisis sanguíneo en bovinos lecheros es un valioso complemento para el examen clínico individual y el manejo de rodeo (productivo, nutricional y reproductivo). Los desvíos en los valores de la composición bioquímica y corpuscular de la sangre rinden información objetiva en el proceso del diagnóstico diferencial, supervisión del tratamiento, formulación del pronóstico, orientación hacia una investigación posterior y prevención enfermedades (Marcos, 1980).

Para la evaluación de los resultados es necesario el conocimiento de la variabilidad de los componentes y características de la sangre producida por factores fisiológicos, patológicos y errores metodológicos (Corbellini, 1983).

Debido a la importancia de la determinación del perfil hematológico en la fisiología, clínica y producción bovina, se describirán a continuación las características, importancia, valores de referencia y desvíos de las principales variables hematológicas y de la química sanguínea.

I.2.1. Variables hematológicas:

Las variaciones consideradas normales de la composición cuantitativa y cualitativa de la sangre bovina, dependen de factores internos tales como raza, edad, sexo y en hembras también se ven afectadas por la gestación, parto y lactancia. Las diferencias individuales de la composición sanguínea son amplias, especialmente en animales jóvenes (Barrer y Grindem, 2000).

Según Kolb (1987), entre los factores externos que actúan sobre los parámetros sanguíneos se puede citar alimentación, manejo, influencias ligadas al clima, estación del año, altura, medidas profilácticas y terapéuticas, como también circunstancias inmediatas durante la extracción sanguínea (momento, lugar y técnica).

La hora del día, y con ello las modificaciones sanguíneas debidas a la alimentación, representan menos del 5% de los valores medios en el bovino. A la mañana los valores de hemoglobina, proteínas totales, ácido láctico, fósforo inorgánico, sodio, cobre e hierro son mayores, mientras que los niveles de urea, glucosa, calcio, magnesio y potasio, así como las actividades de las enzimas séricas, alcanzan el mínimo diario (Swenson y Reece, 1999).

Son importantes las consecuencias del estrés provocado por la extracción de la muestra. Las reacciones neurohormonales ocasionadas por el arreo, fijación, dolor a la punción, modifican la concentración de algunos componentes hemáticos del 5 hasta el 15 % (García Sacristán, 1995).

La composición de la sangre varía con la compresión (éstasis) prolongada de la vena a punzar, ya que se produce un aumento del valor de hematócrito y de la hemoglobina; 20 a 30 minutos mas tarde disminuye el número de leucocitos eosinófilos y el nivel de glucosa aumenta, mientras que varían los valores de la actividad de la fosfatasa alcalina, lactato-deshidrogenasa, así como de los 11-hidroxicorticosteroides (Schalm, 1981).

Para la extracción consecutiva de muestras de sangre, con pausas de varias horas, puede utilizarse una cánula en la vena yugular, provista de un mandril, si el animal permanece atado con un bozal durante todo el período de extracción (Rosenberger, 1981).

Para una permanencia de varios días o semanas puede utilizarse un catéter hueco de cloruro de polivinilo ó teflón (50 a 100 cm de largo, 1 a 2 mm de grosor), el cual debe introducirse bajo normas de esterilidad, fijándose luego a la superficie corporal del

animal. Para evitar la obstrucción del catéter permanente durante los intervalos y extracción por coágulos de sangre, Williams y col. (1990) consideran que debe lavárselo con solución fisiológica (50 a 5000UI/ml).

Se reconocen tres clases de células sanguíneas (corpúsculos): eritrocitos (células rojas), leucocitos (células blancas) y trombocitos (plaquetas) (Ruckebush y col., 1994).

I.2.1.1. Eritrograma

El eritrograma es un eficaz indicador del estado nutricional (Williams y col., 1990) e integra el panel explorador que informa sobre el correcto manejo del ganado (Habich, 1982). Sus alteraciones pueden orientar el diagnóstico hacia determinadas deficiencias alimentarias (Kolb, 1987). Asociado a la evolución del peso y a los síntomas clínicos, el eritrograma provee información objetiva y certera sobre eventuales carencias alimentarias, capaces de alterar los niveles de hemoglobina (transporte de oxígeno), transferrina (transporte de hierro), ferritina (almacenamiento de hierro), ceruloplasmina (transporte de cobre), transcobalamina (transporte de vitamina B12) y otros parámetros bioquímicos (Slobodianik y col., 1999).

Los glóbulos rojos (GR) en la sangre son cuantificados mediante el recuento celular ($GR \times 10^{12}/l$), determinación del contenido de hemoglobina (Hb) (g/l) y medición de hematócrito (Hto) o volumen celular aglomerado (VCA) como porcentaje. Como en esencia toda la hemoglobina está presente dentro de los eritrocitos, el recuento eritrocitario, Hto y contenido de Hb presentan un comportamiento paralelo entre sí cuando existen cambios (Meyer y Harvey, 2000).

El número de GR por litro de sangre puede determinarse mediante el recuento con cámara (exactitud: ± 10 a 20%) o con contador electrónico de GR (exactitud: $\pm 5\%$), este último se utiliza sobre todo para exámenes de sangre en serie (Jain, 1993).

En el feto bovino, el número de GR aumenta en la segunda mitad de gestación, llegando paulatinamente a $6-7 \times 10^{12} /l$. Después del nacimiento, durante las 2 a 3

primeras semanas de vida, comienza la eritropoyesis en la médula ósea, mientras que los GR envejecidos son destruidos en cantidades crecientes. En las semanas siguientes la eritropoyesis está limitada por la escasez de hierro de la alimentación con leche (carne blanca del ternero); por ello, los terneros criados exclusivamente con leche suelen mostrar una moderada a intensa anemia ferropriva. Aún así, el número de GR por litro de sangre suele ser algo más alto en terneros y animales jóvenes que en adultos sanos. Además, los machos sexualmente maduros presentan cifras mayores que las hembras de la misma edad y condiciones (Rosenberger, 1981).

En bovinos, el número de eritrocitos en sangre es desde 7 hasta 10×10^{12} /l; (Meyer y Harvey, 2000). La cantidad varía mucho dentro de especies y entre individuos por la edad y/o enfermedad (García Sacristán, 1995).

En la hembra, el número de GR disminuye en el transcurso de la gestación, para aumentar al momento del parto y normalizarse en los 10 días siguientes. Las vacas de alta producción láctea pueden mostrar igualmente una leve anemia alimentaria debida entre otras causas, a un insuficiente suministro de proteínas, hierro, cobre o cobalto. (Swenson y Reece, 1999).

En el bovino se considera anemia leve con $3,5$ a 5×10^{12} /l; moderada con $2,5$ a $3,5 \times 10^{12}$ /l o intensa (con menos de $2,5 \times 10^{12}$ /l). El descenso del número de GR a menos de $1,5 \times 10^{12}$ /l de sangre se considera un síntoma de pronóstico desfavorable (Rosenberger, 1981).

El Hto se relaciona positivamente con el número de glóbulos rojos y con el tenor de hemoglobina sanguínea del animal. En la sangre periférica, el Hto es algo mayor que en vena yugular o mamaria. En bovinos adultos, los valores de Hto son aproximadamente desde 24 a 46 %. En pacientes anémicos, el Hto desciende por debajo del 25%, mientras que en la deshidratación se obtienen valores de 40 a 45% y más aún (hemoconcentración) (Jain, 1993).

La Hb de fetos bovinos es de 80 a 100 g/l en la segunda mitad del desarrollo intrauterino. Al nacer, la hemoglobina fetal diferenciable por electroforesis es de 80% de la total. Entre los 2 y 3 primeros meses de vida se reemplaza por Hb adulta. Los terneros tienen un mayor tenor de Hb en sangre, considerándose los valores inferiores a 70 g/l como levemente anémicos, y los inferiores a 40 g/l, como intensamente anémicos. En establecimientos de engorde de terneros, la Hb no debe descender a menos de 60 g/l de sangre, si la alimentación y el manejo son correctos (Schalm, 1981).

Los valores de hemoglobina y VCA son mayores en verano que en invierno. Están influenciados por la lactación, la preñez, pudiendo existir una relación directa entre sus niveles y la fertilidad (Wilhelm, 1985).

El potencial de transporte de oxígeno de los eritrocitos se expresa por índices: volumen corpuscular medio (MCV), concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC) y Hb corpuscular media (MCH) (Ruckebush y col., 1994).

El volumen corpuscular medio de los GR (mean corpuscular volume = MVC) representa el volumen promedio de un eritrocito solitario expresado en fentolitros (10^{-15} l). Se lo determina con mayor precisión mediante la medición directa con contadores celulares electrónicos. Se puede dosar en forma indirecta dividiendo el Hto (como porcentaje) por el recuento eritrocitario (en millones de células/ μ l) multiplicando por 10, en el bovino este nivel se encuentra entre 37-51 10^{-15} fl. Con ayuda de este valor las anemias se dividen en normocíticas, microcíticas y macrocíticas (Gómez Piquer, 1992).

La concentración de hemoglobina corpuscular media (mean corpuscular hemoglobin concentration = MCHC) representa la concentración de Hb promedio dentro de los glóbulos rojos. Se calcula dividiendo el valor de la Hb (en g/dl) por el Hto (como porcentaje) y multiplicado por 100. La CHCM se expresa como g/dl de eritrocitos. En el bovino normalmente es de 33 a 37 g/dl y permite, al igual que el MCH, dividir las anemias en normocrómicas e hipocrómicas (Meyer y Harvey, 2000).

La Hb corpuscular media (mean corpuscular hemoglobin = MCH) se calcula dividiendo el valor de la Hb (en g/dl) por el recuento de GR (en millones/ μ l) y multiplicando por 10. La HCM no aporta un valor adicionado, por que depende de VCM y CHC. Por lo usual se correlaciona en forma directa con VCM, excepto en animales con glóbulos rojos macrocíticos hipocrómicos (Meyer y Harvey, 2000).

I.2.1.2. Leucograma

Leucograma es el conjunto de pruebas de laboratorio que informan sobre la cantidad y calidad de los glóbulos blancos circulantes en sangre. En hematología constituye una herramienta imprescindible para tipificar infecciones e inflamaciones, pues permite diferenciarlas en agudas y crónicas, brindando también pistas sobre probables etiologías tóxicas, neoplásicas, metabólicas, alérgicas, parasitarias y endocrinológicas (Balcells, 1978; Ióvine y Selva 1981; Kalinov, 1984; Coles, 1989 y Gómez Piquer, 1992).

En el bovino, el número de leucocitos aumenta continuamente durante la segunda mitad de la vida intrauterina, alcanzando al nacer 6 a 12 x 10⁹/l de sangre (Rosenberger, 1981).

Durante su crecimiento, la concentración de glóbulos blancos decrece hasta alcanzar los niveles normales de la adultez, desde 12,0 hasta 9,1 x 10⁹/l (Benjamín, 1967), desde 8,0 hasta 7,0 x 10⁹/l (Durr y Kraft, 1980), desde 10,7 hasta 8,0 x 10⁹/l (Jain, 1993), o desde 4,0 hasta 12 x 10⁹/l (Meyer y Harvey, 2000). Los leucocitos totales varían escasamente por el sexo pero mucho por la edad.

Entre las hormonas capaces de modificar el leucograma se encuentran las catecolaminas (alarma simpática) y los glucocorticoides (estrés). Las primeras de ellas participa en el síndrome de lucha y fuga, breve reacción de urgencia que involucra la médula adrenal (adrenalina); en tanto que los segundos lo hacen en los términos del síndrome general de adaptación, estrés, proceso más duradero que compromete la corteza adrenal (cortisol, aldosterona), cuyo fracaso implica el deterioro del estado de

salud (Kaneko, 1989; Acosta y col., 1990; García Sacristán, 1995; Swenson y Reece, 1999).

En la alarma simpática, los glóbulos blancos aumentan su concentración a expensas de todos los tipos leucocitarios, mientras que en condiciones de estrés se elevan solamente los neutrófilos, disminuyendo linfocitos y eosinófilos (Best y Taylor, 1986; Coles, 1989; Kaneko, 1989; Gómez Piquer, 1992).

En las alarmas simpáticas, las modificaciones serían pasajeras (“leucocitosis fisiológicas”), perdurando de 30 minutos (Jain, 1993) a una hora, pero más prolongadas en el estrés, debido a que en el intento de resistir a una noxa, las secreciones de ACTH y corticosteroides serán sostenidas, perdiéndose el ritmo nictameral (Best y Taylor, 1986; García Sacristán, 1995; Swenson y Reece, 1999). Estos cambios serían muy marcados en carnívoros pero poco pronunciados en rumiantes (Jain, 1993).

En bovinos existiría una leucocitosis fisiológica (pasajera) con elevaciones de hasta 15 a $27 \times 10^9/l$ (con neutrofilia) y una leucocitosis del estrés (duradera), con elevaciones de 8 a $18 \times 10^9/l$ acompañadas de neutrofilia, linfopenia, eosinopenia y a veces monocitopenia (Smith y Thier, 1983; Duncan y Prasse, 1994).

En el bovino, la leucocitosis generalmente es la consecuencia reactiva de una infección viral o bacteriana, localizada o generalizada. Por lo general, el aumento de leucocitos se mantiene en valores inferiores a $20 \times 10^9/l$ de sangre, incluso pese a la existencia de procesos purulentos graves (peritonitis purulento-icorosa, pulmonía abscedante), sólo se comprueba leve reacción leucocítica (con o sin desvío a la izquierda). En cambio, el vuelco de agentes bacterianos al torrente sanguíneo en general cursa con leucocitosis notable (Swenson y Reece, 1999).

Una disminución en el número de leucocitos por debajo de $5 \times 10^9/l$ de sangre, se considera leucopenia. Se puede observar al inicio de enfermedades infecciosas o tóxicas graves (en especial de origen viral), una leucopenia pasajera. Si la

leucocitosis es retardada o falta, el pronóstico es desfavorable (trastornos de los mecanismos celulares de defensa) (Rosenberger, 1981).

Los leucocitos se agrupan en series mononucleares y granulocíticas. La primera, incluye linfocitos y monocitos, mientras la segunda se refiere a neutrófilos, eosinófilos y basófilos (Ruckebush y col., 1994).

Los linfocitos responden a la quimotaxis. No son fagocíticos y se relacionan con respuestas inmunitarias. Más del 99 % de los linfocitos se encuentran en tejidos y son pocos los que se encuentran en sangre, ya que los linfocitos recirculan de manera constante entre tejidos y sangre por atravesar el espacio interepitelial en capilares (Ruckebush y col., 1994).

Se reconocen dos tipos funcionales de linfocitos no similares, linfocitos B, para producir anticuerpos circulantes capaces de atacar agentes invasores (inmunidad humoral) y linfocitos T, que son linfocitos activados, designados para destruir agentes extraños (inmunidad mediada por células o celular) (Best y Taylor, 1986).

Los linfocitos serían escasos en sangre de terneros recién nacidos, situación que perduraría hasta los 7 días de vida (Medway y col., 1980). El predominio de los neutrófilos se revertiría luego de la primera semana debido al ascenso de los linfocitos, para ser los glóbulos blancos más abundantes durante el resto de la vida del bovino, sin muchas diferencias atribuibles al sexo. Al nacimiento, el ternero posee $3,9 \times 10^9/l$ (44%), tasa que a los 3 meses aumenta a $6,8 \times 10^9/l$ (64%) (Jain, 1993) o desde $2,5$ hasta $7,5 \times 10^9/l$ (62,4 %) según Meyer y Harvey (2000).

Los monocitos sanguíneos son células temporales que tienen una vida media de 10 h, móvil y también inmadura, con escasa capacidad para atacar agentes infecciosos. Los monocitos muestran diapédesis, actividad ameboidea y quimiotaxis. Una vez fuera de los vasos sanguíneos, los monocitos se activan, aumentan su diámetro hasta cinco veces y su citoplasma se llena de gránulos de lisosomas y mitocondrias, entonces maduran y se denominan macrófagos (Ruckebush y col., 1994).

Varios autores coinciden en que los terneros tendrían valores ligeramente más altos de monocitos que los adultos, durante el crecimiento la tendencia sería declinante (Durr y Kraft, 1980; Coppo y col., 1994; Sanpedro y col., 1994; Coppo y col., 1996). Sin embargo, habría un período en que los monocitos aumentarían en el ternero; de ello se desprende que al nacimiento, registrarían $0,4 \times 10^9/l$ (5%) y a los 3 meses se incrementarían a $0,7 \times 10^9/l$ (8%). Desde allí en adelante, descenderían hacia valores de adulto, establecidos entre $0,02$ a $0,80 \times 10^9/l$, que en términos relativos significan 2 a 7%, sin grandes diferencias entre sexos (Jain, 1993; Meyer y Harvey, 2000).

Los neutrófilos son los granulocitos más numerosos, esenciales en la defensa contra los microorganismos invasores, en particular bacterias. Para ser eficaces deben reconocer señales inflamatorias, abandonar la sangre, migrar a través de los tejidos hasta un sitio donde haya bacterias y luego neutralizarlas (Meyer y Harvey, 2000).

Los neutrófilos en la primera semana de vida son los leucocitos más abundantes en la sangre de los terneros, predominando sobre los linfocitos (Medway y col., 1980). Durante el primer año de vida, registran disminuciones hacia el valor normal del adulto; la fórmula leucocitaria del bovino no presenta variaciones entre sexos pero si por la edad. Al nacimiento, la concentración de neutrófilos es de $4,8 \times 10^9/l$ (47%); a los tres meses disminuye a $2,8 \times 10^9/l$ (26%); en adultos oscila entre $0,6$ y $4,0 \times 10^9/l$, representando valores relativos medios de 45% (Meyer y Harvey, 2000).

Las funciones de los eosinófilos no están definidas por completo. Son muy móviles, tienen limitada capacidad fagocítica y representan una mínima defensa contra las bacterias o agentes virales. Son activos en la destrucción de parásitos metazoarios (tremátodes y estadios tisulares de helmintos) que tienen anticuerpos y/o complemento unidos a sus superficies. Los eosinófilos liberan sustancias que inhiben algunos de los efectos inflamatorios de la degranulación de las células cebadas. Si embargo, los eosinófilos activados también generan mediadores inflamatorios, que pueden generar lesiones tisulares (Meyer y Harvey, 2000).

Se encuentran en pequeño número en la sangre circulante, pueden incrementarse mucho en condiciones alérgicas, choque anafiláctico y ciertos parasitismos (Swenson y Reece, 1999).

Los niveles de eosinófilos son más bajos en la joven edad (Coppo y col., 1994; Coppo y col., 1996). Si bien están exentos de diferencias sexuales, los eosinófilos varían durante el crecimiento, registrándose un constante aumento en el primer año de vida. Los terneros de 3 meses poseen niveles de $0,1 \pm 0,3 \times 10^9/l$ (0,7%) y las vacas adultas $0,7 \times 10^9/l$ (9%) (Jain, 1993) o de 0 a $2,4 \times 10^9/l$ (0 a 20 %) (Meyer y Harvey, 2000).

Los basófilos se presentan en la sangre normal en pequeña cantidad (0,5% de los leucocitos sanguíneos totales). No se estableció totalmente su función específica. El poder fagocítico es ligero o inexistente. Podrían ser las formas circulantes de los mastocitos y tienen en esencia una función secretoria. Liberan grandes cantidades de heparina, histamina, además de pequeñas cantidades de bradiquinina y serotonina. (Swenson y Reece, 1999).

En comparación con la fórmula leucocitaria diferencial de otras especies, la sangre del bovino se caracteriza por un elevado componente linfocitario (Kolb, 1987). En el período del 4° al 6° mes fetal los linfocitos están presentes en un 70 a 80% y disminuye luego hasta el nacimiento a un 50%; en cambio, los granulocitos neutrófilos aumentan en la segunda mitad de la gestación, de 10 a 40%, por el contrario las cifras de los demás leucocitos sólo se modifican levemente durante la vida intrauterina (Meyer y Harvey, 2000).

Luego del nacimiento el porcentaje de linfocitos y monocitos se modifica, aumentando en relación directa con el peso corporal, pero el número absoluto de linfocitos por litro desciende continuamente hasta el 5° año de vida (Swenson y Reece, 1999).

La preñez avanzada no produce modificaciones en la fórmula diferencial; únicamente unos días antes del parto aumenta el número de granulocitos eosinófilos;

como expresión de estrés del parto, tanto la madre como el ternero muestran un aumento del número de leucocitos, del componente neutrófilo de los granulocitos, y una notable eosinopenia, con normalización en el transcurso de una semana. Como reacción

general de estrés se considera una leucocitosis y eosinopenia que se desvía un 50% de los valores iniciales (Ruckebush y col., 1994).

Entre las disminuciones patológicas del número de leucocitos por litro de sangre (leucopenia o leucocitopenia) se puede distinguir según el tipo celular mas afectado entre neutropenia y linfocitopenia, a veces se puede acompañar con eosinopenia. La disminución simultánea de todas las formas de granulocitos, incluso sus predecesores inmaduros en sangre periférica (granulocitopenia) indica un bloqueo infeccioso o tóxico de las defensas celulares, o un daño de las funciones mielopoyéticas de la médula ósea, por ejemplo, en la intoxicación crónica con furazolina (Kolb, 1987).

En enfermedades infecciosas agudas o inflamaciones, la leucocitosis es siguiente a la leucopenia inicial y se caracteriza por el aumento de granulocitos con núcleo en cayado o juveniles. En estadios tardíos de la enfermedad predomina entonces el componente celular maduro, granulocitos neutrófilos segmentados; mientras que las enfermedades crónicas pueden cursar con linfo o monocitosis (Rosenberger, 1981).

Los desvíos graves de la fórmula blanca causados por enfermedad son escasamente observados en el bovino. Una linfocitosis benigna, duradera, se presenta en esta especie ocasionalmente en procesos purulentos crónicos (abscesos hepáticos, peritonitis o pericarditis por cuerpo extraño, neumonía abscedante), pero también en parasitosis crónicas (babesiosis) y después de grandes pérdidas de sangre. Una linfocitosis de este tipo benigna debe (considerando los hallazgos palpatorios del aparato linfático) distinguirse de la linfocitosis maligna persistente en la leucosis bovina (Gómez Piquer, 1992). El aumento de granulocitos eosinófilos en la sangre (eosinofilia), permite suponer la existencia de una reacción alérgica o invasión parasitaria (Coles, 1989).

1.2.1.3. Plaquetas

Las plaquetas sanguíneas (trombocitos) en los mamíferos, son fragmentos celulares enucleados, diminutos, redondos u ovales, que se forman a partir de los cilindros de citoplasma de los megacariocitos (Schalm, 1981).

Estos elementos figurados son numerosos en la sangre circulante, aunque existen considerables variaciones interespecíficas. Los recuentos plaquetarios en el bovino oscilan desde 200 hasta 800 x 10⁹/l (Meyer y Harvey, 2000). La principal función de las plaquetas es evitar hemorragias en lesiones de vasos sanguíneos, sus propiedades están centradas en la hemostasis y la trombosis (Ruckebush y col., 1994).

1.2.2. Variables bioquímica

1.2.2.1. Electrolito

El examen del estado electrolítico total de la sangre abarca la determinación cuantitativa de todos los aniones y cationes del plasma, requiriendo exactos análisis fotométricos de absorción (Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺, Na⁺, P_i, Cl⁻), espectrofotométricos de emisión (Na⁺, K⁺, Ca²⁺) o espectrométricos de absorción atómica (Ca²⁺, Mg²⁺) (Ióvine y Selva, 1981).

Clínicamente, por lo general, se determinan los niveles de Cl⁻, HCO₃⁻ y Na⁺ (eventualmente también K⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺) y de acuerdo con ellos se concluye el comportamiento de todos los aniones restantes (HPO₄²⁻; SO₄²⁻, ácidos orgánicos, proteínas). El ionograma tiene importancia sobre todo en relación con la evaluación del equilibrio hídrico y ácido básico (Rosenberger, 1981).

Los seres vivos requieren de sustancias minerales para muchos procesos vitales. Algunos de los elementos inorgánicos que participan en forma ionizada en el metabolismo son el calcio, fósforo, magnesio, sodio, potasio y hierro (Piccione y col., 2004).

Los intervalos de referencia obtenidos por diferentes autores para los valores de sodio, potasio, calcio, fósforo y magnesio en muestras de suero de bovinos adultos se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Valores de referencia de electrolitos plasmáticos para bovinos adultos

Variable (mmol/l)	Althaus y col. (1991)	Bajksy y col. (1999)	Meyer y Harvey (2000)	Coppo (2001)
Sodio	142-150	141-143	136-144	130-146
Potasio	5,1-5,5	3,7-4,1	4-5,3	3,3-5,1
Calcio	1,92-2,39	1,25-1,30	1,98-2,5	2,1-2,33
Fósforo	1,36-1,58	1,5-2,9	1,32-1,68
Magnesio	0,7-1,1	0,8-1,1

I.2.2.1.1. Calcio

El calcio es uno de los cinco minerales más abundantes del organismo. Más del 90% del mismo se localiza en el tejido óseo. Sin embargo, su importancia no se limita a la función estructural que cumple en huesos y dientes; el calcio es esencial en la mayoría de las reacciones de la coagulación sanguínea, en la regulación de la excitabilidad de las fibras musculares, contracción muscular, permeabilidad de membrana, conducción nerviosa y secreción láctea (Gómez Piquer, 1992).

El calcio en plasma existe en tres formas: libre (ionizado); en complejos con bicarbonato, citrato y fosfato; y fijado a proteínas plasmáticas (albúmina, globulina) (Dauth y col., 1984). La fracción libre predominante (55% de plasma total) está en intercambio constante con los líquidos extracelulares, observándose fluctuaciones fisiológicas debidas a edad, sexo, embarazo y actividad física (Sigsgaard-Andersen y col., 1980).

Es uno de los constituyentes séricos mejor regulados. Su nivel depende del balance entre la absorción intestinal y su excreción urinaria, fecal y en hembras preñadas además, por su paso al feto y a la leche (Swenson y Reece, 1999).

El metabolismo de iones calcio se regula principalmente por tres hormonas: dos hormonas hipercalcémicas (1,25-dihidroxicolecalciferol o vitamina D3 y paratormona (PTH) y una hormona hipocalcémica (calcitonina CT) (Rasmussen y Gustin, 1978). Los principales tejidos blancos de estas hormonas son el intestino (vitamina D3 y PTH), para la entrada de Ca^{2+} a los líquidos del organismo; los huesos, por regulación minuto a minuto del almacenamiento (CT, Vitamina D3) o disponibilidad (PTH) de Ca^{2+} , y los riñones para resorción (PTH) ó para excreción (CT) de Ca^{2+} (Ruckebush y col., 1994).

Otras hormonas que también regulan el metabolismo del calcio son estrógenos, glucagón, glucocorticoides, hormona de crecimiento, insulina, prolactina y tiroxina (Best y Taylor, 1986).

El nivel de calcio puede estar influenciado por los glucocorticoides (inhibe la absorción intestinal y facilita la eliminación renal de calcio) citratos (efecto quelante) y sulfato de sodio (aumento de la diuresis de calcio). Los niveles séricos de calcio pueden tener influencia en la acción de ciertas sustancias; en particular mejora la acción de la digital y antagoniza los efectos de verapamil y de otras drogas bloqueadoras de canales de calcio (Piccione y col., 2004).

Muchos aspectos metabólicos, productivos y fisiológicos están involucrados en la ritmicidad del calcio, cambios en estos ritmos pueden indicar un riesgo y/o la presencia de patología aún no evidente (Piccione y col., 2004).

Durante la gestación avanzada la concentración de Ca^{2+} y Mg^{2+} sérico aumenta (Peterson y Walderm, 1981; Barton y col., 1987); en el momento del parto las mismas descienden (7 y 3 mg/100 ml respectivamente) (hipocalcemia e hipofosfatemia fisiológicas), luego se estabilizan durante la segunda a cuarta semanas posteriores al parto (Rosenberger, 1981). Durante el período de secado se produce una gran

movilización de Ca^{2+} de los huesos junto a un gran desarrollo fetal en la vaca gestante (De Luca, 1988).

Según Naito y col. (1990), antes y después del parto se produce una depresión de la función de los osteoblastos en la vaca, con disminución de la osteocalcina y calcio en sangre. La osteocalcina es una proteína producida por los osteoblastos que contiene gama carboxiglutamato (Ganong, 1988), encargada de fijar Ca^{2+} en la proteína (Peterson y Walderm, 1981).

Antes del parto se produce una disminución concomitante del calcio y la osteocalcina, y un aumento del $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (Naito y col., 1990; Sommer, 1975), no existiendo correlación entre $1,25(\text{OH})_2\text{D}$; Ca^{2+} ; y osteocalcina (Peterson y Walderm, 1981; Naito y col., 1990).

Considerando que el $1,25(\text{OH})_2$ no influye sobre el flujo de Ca^{2+} en los huesos, pero sí en el intestino, entonces la calcemia antes del parto se debe a una alteración en la actividad del hueso, producida por los niveles hormonales de gestación y parto, no estando compensado por la absorción de Ca^{2+} desde el intestino (Peterson y Walderm, 1981).

En bovinos, la concentración sanguínea de calcio se ve afectada por el estado de producción de leche sólo cuando los aportes de vitamina D en la dieta son inadecuados (Wilhelm, 1985). El descenso de Ca^{2+} sérico ($< 1,75\text{mmol/l}$) produce parálisis de la musculatura estriada y lisa, caída en decúbito esternal, cuello doblado hacia un costado, cabeza apoyada y obnubilación comatosa de la conciencia. (Herdt, 2000).

La hipocalcemia se observa en la paresia puerperal (hipocalcemia de las vacas lecheras), pancreatitis aguda, hipotiroidismo, raquitismo, osteomalacia, insuficiencia renal crónica, grave acidosis o alcalosis ruminal, deficiencia en vitamina D y ayuno prolongado en vacas lactantes (Claypool, 1976).

La relación $\text{Ca}^{2+}/\text{P}_i$, según el Consejo Nacional de Investigaciones de EE.UU., debe oscilar entre 1,2 a 2 mmol Ca^{2+} / mmol P_i (Stogdale y Gundin 1983).

I.2.2.1.2. Fósforo

El fósforo se encuentra en el organismo formando parte de compuestos orgánicos (proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, etc.) o como fosfatos inorgánicos cumpliendo funciones diversas, tanto en el transporte de energía como en la estructura de los tejidos y el mantenimiento del pH de los líquidos corporales. Es constituyente esencial de los tejidos óseo y muscular y participa en la composición del tejido nervioso (Guyton, 1991).

Su concentración en circulación está regulada, entre otros factores, por los niveles de vitamina D y las glándulas endócrinas, observándose variaciones fisiológicas de acuerdo a la edad, ingesta, actividad física, gestación, etc. (Meyer y Harvey, 2000).

El fósforo inorgánico (P_i) presenta un comportamiento inverso al del Ca^{2+} , disminuyendo a medida que se aproxima la fecha de parición. Este comportamiento inverso del Ca^{2+} y P_i , antes y después del parto es informado por varios autores (Sommer, 1975; Barton y col., 1987; Althaus y col. 1991).

En bovinos, algunos autores consideran que las concentraciones de fósforo son más bajas durante la lactación temprana y que varían según el estado fisiológico del individuo (Peterson y Waldern, 1981). Sin embargo, otros no observan esta influencia (Rowlands y col., 1975) o indican que es muy pequeña (Oregui y col., 1988). En trabajos basados en la evaluación del contenido mineral en suero y en vacas repetidoras Holstein no se encontraron diferencias significativas en cuanto al estado reproductivo, edad, número de servicios, número de parto, ni con otros minerales (Gómez-Tagle, 1993). Kozłowska y col. (1981) observaron en vacas preñadas una disminución en la concentración del fósforo a medida que avanzaba la gestación.

La hipofosforosis de origen alimentario provoca daños esqueléticos, produciendo en el bovino joven raquitismo y en el adulto osteomalacia, con niveles de P_i inferiores a 4 mg/100ml y 3 mg/ml, respectivamente (Wilhelm, 1985).

La dependencia recíproca del metabolismo del Ca^{2+} , Mg^{2+} y P_i , hace que las graves hipocalcemias o hipomagnesemias con frecuencia cursen con una disminución del P_i sérico (Smith, 1996).

I.2.2.1.3. Magnesio

El magnesio es uno de los iones más abundantes del organismo. El 60 % del Mg del organismo se encuentra en los huesos y el resto esta repartido en músculo y otros tejidos blandos (Best y Taylor, 1986).

El Mg^{2+} participa en el metabolismo energético a través de la activación del ATP, en la transferencia de fosfatos de alta energía y es el ion activador de muchas enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos, hidratos e carbono y proteínas (Reinhardt y col., 1988).

Este elemento es un mediador en mecanismos de conducción y transporte a través de membranas. Es esencial en la preservación de estructuras macromoleculares de DNA, RNA y ribosomas y en la formación del hueso y el mantenimiento de la presión osmótica (Swenson y Reece, 1999).

La regulación de la concentración de magnesio en sangre aún no está totalmente esclarecida. Existiría una relación con la concentración de calcio, el magnesio proveniente de la dieta y la acción de las glándulas adrenales, tiroides y paratiroides (Wilhelm, 1985).

El descenso de Mg^{2+} sérico a cifras menores de 0,6 mmol/l tiene como consecuencia una mayor excitabilidad (tetania latente), en casos más graves, acompañados de hipocalcemia, también hay espasmos tónicos-clónicos (tetania

manifiesta). Las causas de este síndrome, denominado según las circunstancias como tetania de las pasturas, de establo, de transporte, o del ternero, se originan en un trastorno alimentario de suministro de Mg^{2+} (Rosenberger, 1981).

En rumiantes, la tetania hipomagnésica es una compleja alteración metabólica que es susceptible a cambios ambientales y nutricionales. La hipomagnesemia ocurre por el suministro de una dieta insuficiente en magnesio y a la baja eficiencia de absorción a nivel intestinal (Ruckebush, 1994).

El magnesio se puede absorber desde el retículo y rumen a través de una vía transcelular, y dicha absorción puede verse interferida por muchos factores como la presencia de ácidos orgánicos, excesos de potasio y calcio, o déficit de sodio (Sandoval y col., 1998).

En vacas secas se observan bajos niveles de Mg^{2+} , mientras que lo contrario ocurre en vacas en producción. Durante el invierno se observa una reducción de iones magnesio en hueso, plasma y líquido cefalorraquídeo (Wilhelm, 1985).

1.2.2.1.4. Sodio

El sodio está presente en los animales principalmente como ion sódico (Na^+). Las funciones principales están en conexión con la regulación de la presión osmótica cristalóide, el equilibrio ácido básico, el mantenimiento de los potenciales de membrana y la transmisión de los impulsos nerviosos (Maltz y col., 1994).

El sodio es el principal soluto del fluido extracelular y es mantenido en un rango de estrecha variación. Es determinante en la osmolaridad plasmática y, por lo tanto, responsable de la mantención del volumen del líquido extracelular. Modificaciones de su concentración reflejan cambios en el balance del fluido extracelular (Rose, 1981).

En bovinos adultos, la concentración sérica del ión sodio se encuentra entre 130 a 150 mmol/l (Tabla 2). En vacas en producción desciende durante el verano (Wilhelm, 1985).

I.2.2.1.5. Potasio

El potasio es el principal catión intracelular, y sirve a las mismas funciones generales que se relacionan con la regulación de la presión osmótica y el equilibrio ácido-básico en las células, al igual que lo hace el sodio en los líquidos extracelulares (Guyton, 1991).

En bovinos, la concentración plasmática de potasio es de 3,3 a 5,5 mmol/l (Tabla 2). En verano desciende existiendo una relación directa entre su concentración sanguínea y la fertilidad (Wilhelm, 1985).

En la homeostasis del equilibrio hidrosalino cumplen un destacado papel el sistema renina-angiotensina-aldosterona. La función principal de la aldosterona, es mantener el volumen del líquido extracelular a través de un balance adecuado de agua, sodio y potasio, mediante su acción a nivel del túbulo renal y glándulas sudoríparas, reteniendo sodio y secretando potasio (Swenson y Reece, 1999).

I.2.2.2. Metabolitos del suero

En la Tabla 3, se presentan los valores medios de glucosa, triglicéridos, colesterol, bilirrubina total y creatinina para bovinos adultos.

Tabla 3. Valores de referencia de variables bioquímicas séricas para bovinos adultos

Variable	Corbellini, 1983	Althaus y col., 1992	Meyer y Harvey, 2000	Coppo, 2001
Glucosa (mmol/l)	2,3-3,8	3,9-4,9	2,0-3,9	2,7-3,4
Triglicéridos (μ mol/l)	--	--	0-0,154	0,19-0,52
Colesterol (mmol/l)	2,97-4,91	2,46-4,42	2,26-6,60	2,4-3,4
Bilirubina total (μ mol/l)	3,42-5,00	--	1,71-5,13	--
Creatinina (μ mol/l)	--	--	62-97	--

I.2.2.2.1. Glucosa

En rumiantes es necesaria una concentración de glucosa en sangre de aproximadamente 1,65-3,30 mmol/l para que la mayoría de los tejidos del organismo mantengan sus procesos fisiológicos normales. Estos valores son notablemente menores que en otras especies o en el hombre y también que en terneros alimentados exclusivamente con leche (Ruckebush, 1994).

En bovinos, debe tenerse en cuenta las particularidades del metabolismo de los hidratos de carbono, debido a que los carbohidratos precursores de glucosa ingeridos con la dieta, son utilizados por microorganismos ruminoreticulares, convirtiéndolos primeramente en ácidos grasos de cadena corta. Después de que tales ácidos son absorbidos y llegan al hígado, se sintetiza glucosa por neoglucogénesis (NG), para pasar a la sangre como glucosa, que es utilizada en los tejidos o acumulada en forma de glucógeno (Swenson y Reece, 1999).

La absorción de glucosa de origen alimentario es muy baja, representa el 15 al 30% de la utilizada por el animal, para el mantenimiento de niveles adecuados de glucemia y glucógeno hepático, depende de la neoglucogénesis hepática (Ndibuallonji y Godeau, 1993). La neoglucogénesis en el bovino es permanente, a diferencia de los monogástricos, en los que aumenta durante el ayuno y no post ingestión.

La glucosa es el principal sustrato energético del cerebro, del feto, de la glándula mamaria y del músculo (Rosenberger, 1981). El sistema nervioso depende completamente de un aporte regular de glucosa para sus requerimientos oxidativos. La glucosa es también indispensable como precursor del glicerol y como agente reductor (formación de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido ó NADPH) para el recambio y síntesis de las grasas de depósito y para el aporte energético anaerobio en el músculo esquelético durante el ejercicio intenso (Guyton, 1991).

En los rumiantes, la cantidad de glucosa utilizada por los tejidos (en g/Kg de peso y por hora) es similar a la de los monogástricos (Swenson y Reece, 1999). Las mayores demandas de glucosa se presentan durante el final de la preñez y la lactación. El fin de la gestación y el comienzo de la lactación se acompañan así de una fuerte NG. En los casos de performances productivas elevadas la NG puede no ser suficiente y hay riesgos de que se produzcan desajustes metabólicos (toxemia, cetosis) (Wilhelm, 1985).

Debido a que tiene un efectivo mecanismo de regulación en el organismo, es un pobre indicador del balance energético y del aporte de la dieta durante la lactancia temprana. Sin embargo, a medida que avanza el período de lactancia sus variaciones reflejan en forma más efectiva los aportes de la dieta (Sommer, 1975).

Además de suministrar energía al tejido mamario, la glucosa es principalmente necesaria para la síntesis glandular de lactosa y de α GP. El disacárido lactosa se sintetiza exclusivamente en la glándula mamaria a partir de glucosa, por lo que a medida que aumenta la producción diaria de leche se eleva la captación de glucosa por la ubre (Bickerstaffe y col., 1974).

La vaca en lactación tiene una necesidad especial de glucosa, ya que la leche contiene unas noventa veces la cantidad de azúcar que tiene la sangre. Los requerimientos de glucosa en una vaca en lactación son aproximadamente de 1100 g por día y un 60 a un 85% es utilizada por la glándula mamaria para la producción de leche (Ndibuallonji y Godeau, 1993).

Antes del parto, algunos autores describen en vacas un aumento de glucosa debido a la acción hiperglucemiante de los glucocorticoides (Olther y Berglund, 1983). La hiperglicemia aparece generalmente en el curso de reacciones de estrés (parto, transportes, medidas de sujeción), luego de la infusión de soluciones de glucosa o grave acidosis láctica del contenido ruminal (Wilhelm, 1985). Niveles bajos en sangre podrían indicar déficit en el balance energético del animal (Herdt, 2000) y redundar en una disminución de los porcentajes de fertilidad

I.2.2.2.2. Colesterol

El colesterol, fisiológicamente, es necesario para la síntesis de sales biliares, vitamina D, hormonas gonadales y corticoadrenales, además de participar en la composición de tejidos y secreciones (Coppo, 2001).

El colesterol proviene de los lípidos alimentarios, pero también existe una activa biosíntesis, principalmente hepática. Su eliminación se efectúa por excreción biliar y láctea (Coppo, 2001). En la sangre, el colesterol total (CT) existe en forma libre o esterificado con ácidos grasos, siendo esta última la predominante (Fruchart y Sézille, 1981) Para ser transportado en plasma o linfa, el colesterol se une a lipoproteínas que lo solubilizan en el agua intravascular (Cirio y Tebot, 2000).

Las lipoproteínas son macromoléculas que incluyen un núcleo de lípidos hidrófobos (triglicéridos, ésteres de colesterol) y una zona superficial hidrofílica (fosfolípidos, colesterol no esterificado y apoproteínas). En base a su densidad de ultracentrifugación, se clasifican en HDL (lipoproteínas de alta densidad, α), LDL (baja

densidad, β), VLDL (muy baja densidad, pre- β) e IDL (densidad intermedia, β -flotadora), las dos últimas muy escasas en animales adultos (Swenson y Reece, 1999).

En el bovino, el nivel de colesterol en sangre, sufre cambios debido a la edad, la alimentación, la gestación o lactación, lo que limita mucho su valor diagnóstico para trastornos de la función hepática (Ruckebush, 1994). Según Marcos (1980), el colesterol aumenta desde 2,77 mmol/l al comienzo de la lactancia hasta 4,25 mmol/l luego de los 30-45 días. Este aumento en la concentración de colesterol también es informado por otros autores (Rowlands y col., 1975; Corbellini, 1983).

La disminución en la concentración de colesterol en períodos cercanos al parto se debe a un agotamiento funcional hepático (Sommer, 1975; Marcos, 1980), mientras que el aumento en la concentración de colesterol hacia la octava semana aproximadamente de lactancia, se debe a una movilización de la grasa necesaria para cubrir los gastos energéticos de la lactancia. (Sommer, 1975; Marcos, 1980).

Patológicamente, se eleva en el hipotiroidismo, diabetes mellitus, obesidad, síndrome nefrótico, pancreatitis aguda, ictericia obstructiva, hiperadrenocorticismos, ciertas retinopatías y otros trastornos, disminuyendo en la insuficiencia hepática, mal absorción e hipertiroidismo (Kaneko, 1989; Watson, 1994; Coppo, 2001). Es bien conocido su rol en el proceso aterogénico, del cual no están exentos los animales domésticos (Kaneko, 1989). Los niveles bajos de colesterol pueden indicar debilidad o mal absorción de grasa pero son de muy rara incidencia.

I.2.2.2.3. Triglicéridos

Los triglicéridos son lípidos absorbidos en la dieta y también producidos en forma endógena a partir de los carbohidratos (Ruckebush, 1994). Su medición es importante en el diagnóstico y manejo de las hiperlipemias. Estas enfermedades pueden tener origen genético o ser secundarias a otras tales como nefrosis, diabetes mellitus y disfunciones endócrinas. El aumento de triglicéridos se ha identificado como un factor de riesgo en enfermedades ateroscleróticas (Guyton, 1991).

I.2.2.2.4. Bilirrubina total

Es la suma de la bilirrubina directa o conjugada y la bilirrubina indirecta o libre. La bilirrubina indirecta, compuesto de degradación del grupo hem de la hemoglobina, es captada por el hígado para su conjugación y excreción en la bilis (Meyer y Harvey, 2000).

En el hombre y en la mayoría de las especies domésticas, exceptuando el equino, las variaciones de la bilirrubina se interpretan en la siguiente forma:

- Crisis hemolítica: bilirrubina total y bilirrubina indirecta aumentadas.
- Alteración hepática: bilirrubina total, bilirrubina indirecta y principalmente bilirrubina directa aumentadas.
- Obstrucción intra o post hepática: bilirrubina total y bilirrubina directa aumentadas

Las alteraciones hepatocelulares u obstrucciones biliares pueden provocar hiperbilirrubinemias (Wilhelm, 1985).

Para evaluar la función hepática del bovino tiene importancia el valor de bilirrubina total en suero; en animales con hígado sano, en ayuno o puerperio, puede ascender hasta 6,8 mmol/l (Ruckebush, 1994).

I.2.2.3. Componentes nitrogenados del suero

En los últimos años han aparecido muchos trabajos sobre la composición de la sangre de los animales. En la Tabla 4 se resumen los valores medios de proteínas total, albúminas, ácido úrico, urea y creatinina para bovinos adultos, encontrados en algunos de estos estudios. Los valores informados por Corbellini (1983), Althaus y col. (1992) y Coppo, (2001) corresponden a bovinos adultos del hemisferio sur (Argentina); mientras los intervalos de referencia indicados por Meyer y Harvey (2000) corresponden a vacunos adultos del hemisferio norte (USA).

Tabla 4. Valores de referencia de componentes nitrogenados del suero para bovinos adultos

Variable	Corbellini (1983)	Althaus y col. (1992)	Meyer y Harvey (2000)	Coppo (2001)
Proteínas Total (g/l)	72,9-88,2	78,5-89,0	59-77	69-78
Albúminas (g/l)	34-40	28,0-34,0	27-43	30-38
Urea (mmol/l)	2,78-5,07	5,03-6,90	3,55-9,26	2,90-4,40
Creatinina (μ mol/l)	--	--	62-97	--

I.2.2.3.1. Proteína Total

Las proteínas son compuestos orgánicos macromoleculares, ampliamente distribuidos en el organismo. Se distinguen dos grandes grupos de proteínas del plasma: las albúminas y las globulinas. Se separan unas de otras por medios químicos sencillos y determinando la cantidad de cada grupo se obtiene la relación albúmina-globulina (Guyton, 1991).

Los principales contribuyentes a la presión osmótica del plasma sanguíneo son los iones y en una pequeña proporción las proteínas. Sin embargo, la baja constante de presión osmótica de las proteínas es vital para el mantenimiento del sistema cardiovascular (Best y Taylor, 1986).

La producción de anticuerpos puede ocasionar algunas modificaciones en la concentración de gamma-globulina; sin embargo el cambio es más cualitativo que cuantitativo (Meyer y Harvey, 2000).

El incremento en las proteínas totales puede deberse a la deshidratación, la cual presenta una hemoconcentración por vómitos o diarreas, también por un aumento en el

nivel de globulina cuando no existe deshidratación, como en enfermedades hepáticas avanzadas (cirrosis), infecciones crónicas y en algunos casos de neoplasias (García Sacristán, 1995).

Un bajo nivel de proteínas en la sangre origina una reducción en la presión osmótica coloidal del plasma que puede producir edema (Guyton, 1991).

La albúmina de la sangre y las globulinas con excepción de algunas globulinas gamma, son sintetizadas en el hígado. Por lo tanto cualquier proceso que afecte la síntesis de albúmina disminuirá la relación albúmina-globulina (Ruckebush y col., 1994).

Las proteínas totales y sus fracciones albúminas y globulinas, son indicadores del metabolismo nitrogenado en el organismo, y depende de la proteína contenida en el forraje (Kwiatkowski y col., 1993), fase de la lactación (Doornenbal y col., 1988), edad de las vacas (Doornenbal y col., 1988) y estación del año (Chudoba-Drozdoeska, 1984).

Son indicadores nutricionales, el hígado las sintetiza siempre que disponga de los aminoácidos derivados del nitrógeno alimentario. Descartando situaciones patológicas, principalmente hepáticas, intestinales y renales, la disminución de proteínas totales a expensas de las albúminas, señala deficiencia dietaria de proteínas (Kolb, 1987; Coppo, 2001).

En el tiempo comprendido entre los últimos días del período de secado y el parto, se produce un aumento muy grande de glucocorticoides y estrógenos (Hafez, 1989), los cuales aumentan el catabolismo proteico, acompañado de una disminución de los valores de proteínas al acercarse el parto.

I.2.2.3.2. Albúminas

La albúmina es el principal contribuyente de las proteínas totales plasmáticas (aproximadamente 50% de la proteína total) según Guyton (1991). Entre sus múltiples funciones se pueden mencionar, según Meyer y Harvey, (2000):

- transporte de una amplia variedad de sustancias como hormonas esteroides, ácido grasos, bilirrubina, catecolaminas, que en forma libre son insolubles en medio acuoso.
- mantenimiento de la presión coloidosmótica, que estaría relacionado con su bajo peso molecular y su gran carga neta.

Es sintetizada en el hígado, filtrada en el riñón a nivel glomerular y absorbida posteriormente a nivel tubular (Swenson y Reece, 1999). Los aumentos anormales de albúmina son ocasionales y se relacionan casi siempre con la deshidratación que provoca la reducción en el contenido de agua plasmática (Best y Taylor, 1986).

La hipoalbuminemia ocurre en condiciones patológicas tales como pérdida excesiva de proteínas en el síndrome nefrótico, desnutrición, infecciones prolongadas, quemaduras severas. Otras causas son disminución en la síntesis por una dieta deficiente, enfermedad hepática o mal absorción, desórdenes gastrointestinales crónicos y parasitismo gastrointestinal (García Sacristán, 1995).

Las albúminas pueden ser eficaces indicadores de ingesta nitrogenada, muy sensibles al nivel de proteína dietaria (Ricciardino col., y 1997; Contreras, 2000). En bovinos la concentración plasmática de albúmina es menor durante el invierno. En vacas de alta producción los niveles de albúmina son mayores y existe una relación directa entre su concentración sanguínea, fertilidad y producción de leche (Wilhelm, 1985).

I.2.2.3.4. Urea

La urea constituye la fracción de nitrógeno no proteico más importante en la mayoría de los líquidos biológicos (García Sacristán, 1995). En muchas especies animales, la urea no es más que un desecho del catabolismo nitrogenado enteramente eliminado del organismo, en cambio en rumiantes, la urea endógena puede ser utilizada para la síntesis de proteínas en los preestómagos (Rosenberger, 1981). En los rumiantes existe un circuito rumino hepático para la urea. Por ello solamente una mitad de la urea producida en el hígado es excretada con la orina (Meyer y Harvey, 2000).

La digestión microbiana del nitrógeno alimentario produce importantes cantidades de amoníaco, que es parcialmente utilizado por los microorganismos para sintetizar sus proteínas y parcialmente absorbido a través de la pared ruminal para ser transformado en urea en el hígado (Swenson y Reece, 1999).

Más del 60 % de la urea plasmática proviene de la urea ruminal, y el resto procede del metabolismo intermediario. Esta urea es sólo en parte eliminada por el riñón. Una cierta proporción retorna al reticulorumen con la saliva y por difusión directa a partir de la sangre que irriga la pared de los preestómagos. Allí es hidrolizada a amoníaco y CO₂ por las ureasas de la flora epimural y, en menor grado, por las bacterias libres. La urea provee así radicales aminados para el anabolismo proteico en el rumen y estas proteínas serán recuperadas por el organismo del rumiante luego de digestión y absorción en el tracto intestinal (Kolb, 1987).

La concentración de urea en sangre y en otros fluidos orgánicos varía según la proteína consumida, y la relación proteína consumida/energía metabolizada de la dieta (Sommer, 1975; Olther y Wiktorsson, 1983; Stogdale y Gundin 1983). El NH₃ ruminal y la urea plasmática operan como indicadores de la ingesta nitrogenada y de la actividad proteolítica ruminal (Wilhelm, 1985; Leek, 1999).

Al fin de la gestación se produce un incremento en los niveles de urea plasmática debido a que el organismo recurre a la urea endógena, maximizando su aprovechamiento en los preestómagos. La utilización digestiva de urea endógena está

incrementada por las adaptaciones renales (menor eliminación urinaria de urea) y por un aumento de su transferencia a los preestómagos. Este fenómeno es de particular importancia si se considera que durante este período la ingestión de alimentos es menor a los requerimientos, principalmente por causa de la reducción del volumen de los preestómagos (Swenson y Reece, 1999).

Numerosos autores relacionan concentraciones de urea en sangre superiores a 19 o 20 mg/dl con descensos en los porcentajes de gestación, menores tasas de concepción, y descensos del pH uterino durante varios días después del estro (Elrod y Butler, 1993; Ferguson y col., 1993; Butler y col., 1996). Sin embargo, otros no han podido establecer esa relación (Carroll y col., 1988; Trevaskis y Fulkerson 1999).

Bajos niveles sanguíneos (junto a la hemoglobina y albúmina) indican un pobre aporte proteico en la dieta. Su valor puede encontrarse disminuido en insuficiencia hepática crónica (Wilhelm, 1985).

Una elevación de la concentración sérica de urea, se interpreta generalmente como una posible disfunción renal, debida a nefritis, obstrucción de las vías urinarias, falla en circulación renal. Sin embargo, no debe dejarse de lado el hecho de que los valores séricos de urea se encuentran íntimamente relacionados con la dieta y el metabolismo proteico, por lo que cualquier alteración en estas variables se traducirá en un cambio en la concentración de urea en suero (Ruckebush y col., 1994). También aumenta en procesos catabólicos y en animales con dieta rica en proteínas (Leek, 1999). La uremia en bovinos es mayor en verano que en invierno (Wilhelm, 1985).

I.2.2.3.5. Creatinina

La creatinina esta en el cuerpo principalmente en forma de fosfato de alta energía. En los músculos es fuente de energía. En animales jóvenes de crecimiento se encuentra en mayores cantidades (Guyton, 1991). La creatinina, producto de degradación de la creatina, es un compuesto sumamente difusible cuya eliminación del

organismo se efectúa a través del riñón y casi exclusivamente por filtración (Ruckebush, 1994).

El clearance de creatinina endógena es uno de los métodos más frecuentes utilizados como medida de filtración glomerular. Sin embargo, los problemas prácticos, inherentes a la determinación del clearance (tales como la recolección de orina en niños, etc.) han favorecido la difusión de la determinación de creatinina sérica como índice de funcionalismo renal. (Meyer y Harvey, 2000).

De tal forma, se ha podido observar que ambos parámetros resultan importantes tanto en el diagnóstico como en el pronóstico de nefropatías, obstrucciones urinarias (por afecciones de próstata, vejiga, uréter) y anurias reflejas (secundarias a cálculos uretrales, por ejemplo) que pueden producir elevaciones de creatinina, reversibles luego de reparada la afección (Meyer y Harvey, 2000).

Al estudiar la excreción de creatinina, tiene valor el hecho de que los niveles séricos de creatinina casi no son afectados por la creatinina exógena de los alimentos, por la edad, el sexo, el ejercicio o la dieta (Ruckebush, 1994). El nivel de creatinina en suero, aumenta durante la segunda mitad de la gestación y luego del parto se correlaciona negativamente con la producción de leche. Los aumentos patológicos de este parámetro se dan sobre todo en casos de graves enfermedades renales.

La medición de los niveles de creatinina en sangre proporcionan la misma información para el diagnóstico y pronóstico de la función renal que la obtenida por la medición del nitrógeno ureico (Wilhelm, 1985).

I.2.2.4. Enzimas séricas

Las enzimas séricas son proteínas de alto peso molecular que dirigen determinadas reacciones bioquímicas (Jubb y Kennedy 1973). Debido a que sus concentraciones en sangre son extremadamente bajas, se determinan en base a su actividad, expresándose por ello en Unidades Internacionales por litro (U/l) (Wilhelm,

1985). Pertenecen a seis clases distintas (oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y sintetetasas). Según su origen y función, Meyer y Harvey, (2000) establecen tres grupos de clasificación:

- Enzimas plasmaespecíficas (colinesterasa sérica, enzimas de la coagulación sanguínea).
- Enzimas de las glándulas secretoras (α -amilasa, lipasa, fosfatasa alcalina).
- Enzimas citoespecíficas: citoplasmáticas (transaminasas, lactodeshidrogenasas, sorbitoldeshidrogenasa) y mitocondriales (lutamatodeshidrogenasa).

Cada órgano posee una distribución determinada de sus enzimas, muchas veces con especificidad de especie, el llamado “modelo enzimático”, pero hay pocas enzimas órgano-específicas. Dependiendo del grado de daño de un parénquima, las enzimas contenidas en las células de un órgano pasan a sangre, donde pueden determinarse su actividad por fotometría (Medway y col., 1990).

Se produce una modificación de la actividad sérica con motivo de los siguientes procesos patológicos:

- Trastornos de la permeabilidad de la membrana celular (aumento de las enzimas citoplasmáticas) o necrosis celular (aumento de las enzimas mitocondriales). Ejemplos: hepatitis, intoxicaciones, distrofia muscular.
- Incremento en la formación de enzimas. Ejemplo: aumento de fosfatasa alcalina en la hiperplasia de osteoblastos.
- Disminución en la formación de enzimas. Ejemplo: caída de la colinesterasa sérica en la cirrosis hepática.
- Dificultad en la eliminación de las enzimas excretoras. Ejemplo: aumento de la fosfatasa alcalina sérica en las retenciones biliares, o de la amilasa en la obstrucción del conducto pancreático.

En el bovino adulto, las enzimas séricas importantes para diagnóstico son casi independientes de raza, sexo, alimentación y manejo. En cambio, en terneros y animales jóvenes, así como durante la gestación, el parto o el puerperio y la lactación, puede haber mayores desvíos de la actividad normal. Así en vacas viejas durante los 10 días

posparto se notan desvíos más o menos notables del perfil enzimático del suero (Rosenberger, 1981).

A causa de reacciones de estrés (transporte, métodos de sujeción, intervenciones quirúrgicas), luego de la aplicación de medicamentos o neurolépticos se observan leves a moderados aumentos de actividad de ciertas enzimas, los cuales son pasajeros (Kolb, 1987).

En buiatría, el diagnóstico enzimático tiene importancia sobre todo para reconocer y pronosticar daños hepáticos o musculares agudos o crónico recidivantes, que aparecen en el curso de las mas variadas afecciones (Rosenberger, 1981).

En el bovino, el diagnóstico enzimático de la enfermedad de ciertos órganos (corazón, riñones, cerebro, páncreas) no reporta aplicación clínica, la pequeña concentración de las enzimas celulares no provocan aumentos notables de la actividad, aún cuando los daños sean extensos (Swenson y Reece, 1999). Como ninguna de las enzimas intracelulares son realmente organoespecíficas (y en absoluto específicas de una enfermedad determinada), se necesita siempre, para el diagnóstico de laboratorio, establecer una muestra enzimática (Bush, 1982).

En la Tabla 5 se presentan los valores de referencia para las enzimas séricas en bovinos adultos reportados por diferentes autores.

Tabla 5. Valores de referencia de enzimas séricas para bovinos adultos

Variable (U/l)	Althaus y col. (1992)	Corbellini (1983)	Meyer y Harvey (2000)	Coppo (2001)
AST	32,6-72,5	30,0-64,1	48-100	29-45
ALT	-----	-----	17-37	-----
ALP	-----	-----	29-99	116-161

En la Tabla 6 se describe el espectro de análisis enzimáticos en procesos patológicos del bovino; en ocasiones son también necesarios otros parámetros de laboratorio.

Tabla 6. Utilización para el diagnóstico diferencial de las determinaciones de actividad enzimática en el suero bovino

Enzima	Distrofia muscular	Paresia puerperal	Fasciolosis hepática	Cetosis clínica
AST/GOT	●	○		●
GGT			○	○
CK	●	●/○		
ALT/GPT	Tiene escasa significación diagnóstica en el ganado vacuno			

● = Aumento; ○ = Aumento ligero o en determinadas circunstancias.

I.2.2.4.1. Aspartato aminotransferasa (AST/GOT)

Antiguamente conocida como transaminasa glutámico oxalacético (GOT), es una enzima bilocular (citoplasmática y mitocondrial). Se encuentra en mayor concentración en músculo, hígado y corazón. En procesos inflamatorios agudos y necrosis de estos órganos es liberada a la circulación aumentando su concentración normal (Wilhelm, 1985). Permanece elevada por un período largo (1 a 2 semanas), aún cuando el proceso esté en regeneración (Bush, 1982).

Su valoración es muy útil en animales grandes como indicación de lesión muscular o necrosis hepática. La enzima se eleva considerablemente en equinos, en miopatías por ejercicio, durante el entrenamiento, enfermedad de los músculos blandos y en aves en la distrofia muscular (Medway y col., 1990).

I.2.2.4.2. Alanino aminotransferasa (ALT o GPT)

Antiguamente conocida como transaminasa glutámico pirúvica (GPT). La ALT es una enzima unilocular (citoplasmática) que se encuentra en cantidades suficiente en el hepatocito del canino y felino, de manera que puede ser utilizada como enzima específica de hígado en estas especies, mientras que es de escaso o de ningún valor en los bovinos y equinos (Medway y col., 1990).

Enfermedades hepáticas agudas que alteran la permeabilidad celular o producen necrosis, resultan en un aumento apreciable de la actividad ALT en sangre (Jubb y Kennedy 1973). La ALT es muy estable, y se conserva largo tiempo en estado de congelación. La ictericia no altera su determinación, pero debe evitarse la hemólisis (Meyer y Harvey, 2000).

I.2.2.4.3. Fosfatasa alcalina (ALP)

La fosfatasa alcalina del suero es una enzima que cataliza los monoésteres del ácido ortofosfórico en medio alcalino (Jubb y Kennedy 1973). Es una enzima muy estable y puede ser congelada con poca o ninguna pérdida de actividad. Se encuentra en altas concentraciones en hígado, riñón, mucosa intestinal hueso y placenta (Meyer y Harvey, 2000).

En la mayoría de los animales, quizá con excepción del gato, se elimina en su forma natural por el hígado, por lo tanto cualquier obstrucción al flujo de la bilis causa aumento de esta enzima en el suero. El problema se centra en determinar la fuente de esta elevación cuando no es evidente la enfermedad hepática (Wilhelm, 1985).

Se producen elevaciones de la enzima en el suero, en enfermedades del bazo, hígado, riñón, mucosa intestinal o hueso. En la obstrucción biliar se eleva notablemente, las neoplasias óseas malignas causan a veces niveles elevados. También se puede elevar

la ALP por una mayor actividad de los osteoclastos durante el crecimiento del esqueleto, por enfermedades óseas degenerativas en animales adultos, raquitismo, osteomalacia y en osteosarcoma. Durante interferencias con la excreción hepática, debida a una destrucción de las células hepáticas o a una destrucción del conducto biliar. Los resultados se interpretan mejor en conjunción con los niveles de GPT, que generalmente se encuentran aumentados en estos casos (Bush, 1982).

I.2.2.4.4. Amilasa

La amilasa, producida principalmente en el páncreas exócrino y en las glándulas salivales, escinde los enlaces α 1-4 glucosídicos de los polisacáridos (almidón y glucógeno) (Guyton, 1991).

Se encuentra elevada en suero de animales con pancreatitis aguda, también es posible encontrar valores incrementados en cualquier caso de “abdomen agudo” o intervención quirúrgica en regiones próximas al páncreas (Bush, 1982).

Según Meyer (2000), el intervalo de referencia para el valor de amilasa plasmática en bovinos adultos se encuentra entre 12- 107 U/l.

I.3. Temperatura corporal

Los animales homeotermos mantienen su temperatura corporal interna dentro de límites relativamente estrechos e independientes del medio ambiente. Esta habilidad de regular la temperatura es una adaptación evolutiva que les permite desenvolverse a pesar de temperaturas ambientales extremas (Swenson y Reece, 1999).

La temperatura corporal es una importante variable que debe ser estudiada por diversas razones. Primero, la regulación homeostática de la temperatura corporal es un proceso fisiológico esencial en aves y mamíferos que garantiza la estabilidad del medio interno. Segundo, el sistema termorregulatorio funciona en integración con otros sistemas fisiológicos, tales como el respiratorio (jadeo en varias especies de aves y

mamíferos), el digestivo (descarga de saliva y acicalamiento en roedores), el cardiovascular (control de pérdida de calor a través de la vasodilatación y vasoconstricción periférica), y el motor (termogénesis a través del tiriteo de músculos estriados). Tercero, la regulación de la temperatura corporal es un componente necesario en el proceso de la fiebre, la cual juega un importante rol en la respuesta del organismo a las infecciones y enfermedades. Cuarto, la manipulación de la temperatura corporal es un procedimiento estándar en varias prácticas quirúrgicas y terapéuticas (hipertermia en el tratamiento del cáncer o hipotermia durante el trasplante de órganos) (Gordon, 1993).

Más específicamente, la ritmicidad de la temperatura corporal es un proceso primordial para ser estudiado, no solamente para avanzar en el conocimiento de la variación temporal de la homeostasis termal sino también como un medio para facilitar el estudio de la ritmicidad biológica en general (DaSilva y Minomo, 1995).

Para los propósitos termorregulatorios, el cuerpo puede ser dividido en dos partes, central o interna y periférica o externa. La temperatura central es relativamente constante y su rango diario de oscilación es aproximadamente de 0,6-1,0 °C. En los animales domésticos, la temperatura interna normalmente se indica por la medida de la temperatura rectal (Ruckebush, 1994).

La estabilidad relativa de la temperatura interna se mantiene a pesar de los cambios en las condiciones medioambientales. La temperatura periférica del cuerpo es más inconstante y sensible a la temperatura ambiente. Entre la temperatura central y la periférica existe normalmente 4°C de diferencia, permitiendo el intercambio de calor entre el organismo y el ambiente. De no existir la posibilidad de perder calor al ambiente, el calor ganado por los procesos metabólicos causaría en una hora un ascenso fatal en la temperatura central (Kolb, 1987).

La temperatura del cuerpo se regula por células localizadas en el hipotálamo. Existe un centro de pérdida de calor que cuando la temperatura del cuerpo asciende, entonces se activan mecanismos para perder calor y un centro de ganancia de calor que estimula mecanismos que protegen del frío. El aumento de flujo de sangre a la piel y la secreción de sudor en la superficie corporal promueve la pérdida de calor, mientras que los mecanismos de conservación de calor incluyen la vasoconstricción e incremento de la tasa metabólica. Claramente, el estado térmico del cuerpo representa un equilibrio entre los mecanismos de ganancia y pérdida de calor. El núcleo supraquiasmático que se piensa que es el sitio de un reloj biológico, es el eslabón neural entre el área del hipotálamo y las células del SCN (García Sacristán, 1995).

Las actividades metabólicas del organismo completo aportan de manera constante calor y se pueden considerar como la fuente metabólica de calor. Según Stainer y col (1984), el metabolismo o producción de calor, varía de un nivel basal (cuando el cuerpo descansa) a un nivel que puede ser 20 veces más alto (durante actividad muscular intensa).

Los factores que aumentan la producción de calor de los alimentos son el costo de energía de comer, el trabajo de la digestión y el trabajo del metabolismo de los nutrientes. El valor de la energía de comer es casi de 8 Kcal por Kg por minuto en bovinos (Tabla7).

Tabla 7. Energía perdida en bovinos en pastoreo y en bovinos confinados

Actividad	Energía perdida (kcal/día)	
	Confinados	En pastoreo
Comiendo	880	880
Parados	0	380
Cambios de posición	0	70
Caminando	240	1500
Costo de energía extra al pastoreo 2,5 μ cal/d		
Conservación de calor en confinamiento 11,9 μ cal/d		
Pérdida de calor en pastoreo 14,3 μ cal/d		
Pérdida calórica extra por actividad 9 a 32 %		

Fuente: Ruckebush y col., 1994.

CAPÍTULO II. OBJETIVOS

En los últimos años, la evolución experimentada por la explotación pecuaria destinada a generar proteínas de origen animal fue notable. De todas las actividades que involucran al bovino, la que mostró un mayor proceso de intensificación fue el tambo.

El aumento en la producción de leche tanto cualitativo como cuantitativo, una mejor eficiencia de conversión proteica y el logro de un mayor índice de retorno financiero, fueron premisas fundamentales para mejorar las explotaciones lecheras.

El constante incremento en la eficiencia ejercida sobre la producción láctea por animal y hectárea, motivó la profundización de los conocimientos inherentes a los mecanismos fisiológicos, resolviendo los problemas existentes entre los disturbios metabólicos y carenciales ocasionados al inicio de la lactancia y una alta producción lechera.

La estrecha relación entre el ganado lechero y su química sanguínea, se debe a la alta presión de selección genética (mayor producción individual) que han sufrido estos animales, generando alteraciones de numerosos procesos metabólicos y carenciales. El diagnóstico se realiza en base al conocimiento de las variaciones en los componentes sanguíneos.

El análisis químico sanguíneo tuvo aplicación netamente clínica, pero el tiempo le fue otorgando significación en otros aspectos del manejo de los rodeos lecheros. Hoy se le asigna importancia en el campo productivo, nutricional y reproductivo, tanto clínico como preventivo.

El conocimiento de la variabilidad de los componentes sanguíneos, dentro de los cuales, las variaciones temporales constituyen un factor primordial, es un requisito importante al momento de realizar la evaluación de los resultados.

El estudio de la organización temporal de animales y plantas ha generado gran impacto en agricultura y ganadería. La investigación de ecosistemas agrícolas requiere la comprensión del comportamiento de animales y plantas en función del tiempo.

La adaptación temporal proporciona a la especie una capacidad anticipadora que le permite organizar recursos y actividades antes de que sean necesarios. Además consiste en la armonización de las fases de los ritmos de la especie con aquellas de los ciclos ambientales, de modo tal que los ritmos fisiológicos y de comportamiento estén asociados a las fases más propicias del ciclo ambiental para la supervivencia de la especie.

Los factores ambientales pueden tener, sin embargo, una acción directa sobre el ritmo expresado, modificándolo, sin que se involucre al reloj biológico. A este fenómeno Aschoff (1960) lo llamó enmascaramiento y explicaba que se trataba de “condiciones experimentales que podrían ocultar el verdadero Zeitgeber”.

La organización temporal de las funciones orgánicas hace que cada actividad se desarrolle preferentemente a unas horas determinadas, hecho que ocasiona una sucesión de acontecimientos rigurosamente controlada. Debido a ello, los síntomas de algunas enfermedades se manifiestan más frecuentemente a unas horas que a otras, los criterios diagnósticos y de análisis se ven profundamente afectados por la hora del día en que se realicen, el efecto (o la toxicidad) de un fármaco es más elevado o nulo en determinados momentos, entre otros.

La aplicación de la cronobiología en el sector ganadero abarca el crecimiento, la reproducción, la producción y la salud del rebaño. Por ello, la realización de investigación en esta área se ve estimulada cada vez más en los últimos años.

En bovinos, si bien existen trabajos que evalúan en forma puntual algunos componentes sanguíneos, no se llevaron a cabo estudios que analicen la presencia de ritmos en los componentes sanguíneos bovinos y sus asociaciones.

Por otra parte, los escasos trabajos de investigaciones cronobiológicas han sido desarrolladas en el hemisferio Norte, no habiéndose encontrado estudios realizados en el hemisferio Sur en la bibliografía consultada. De igual forma, muchos de estos trabajos cronobiológicos en ganado bovino se llevaron a cabo en condiciones controladas, no habiendo trabajos realizados en explotaciones ganaderas en condiciones pastoriles.

Por todo lo ante expuesto, se considera que la determinación y caracterización (período, amplitud, acrofase, etc) de posibles ritmos biológicos en variables sanguíneas, así como sus asociaciones, brindará un enfoque temporal que redunde en nuevos beneficios para el animal, mejorando la comprensión de la fisiología, la fisiopatología y una mejor aproximación al diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades, contribuyendo de este modo al mejoramiento de la salud y el bienestar animal.

El objetivo general de este estudio fue determinar variaciones cronobiológicas de variables sanguíneas y temperatura corporal en bovinos lecheros bajo sistema de explotación extensiva, valorar los efectos categoría y época del año sobre los ritmos, y determinar asociaciones entre las variables.

Para el cumplimiento de este objetivo se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Establecer las variaciones cronobiológicas en valores de hemograma completo, propiedades bioquímicas sanguíneas y temperatura rectal en bovino Holstein, determinado su ajuste a ritmos diarios.
2. Evaluar el efecto categoría (vaquillona, vaca y toro) sobre las variables hematológicas, bioquímicas sanguíneas y temperatura corporal que presenten oscilaciones con período cercano a 24 horas en bovinos Holstein.

3. Determinar el efecto estación del año sobre los ritmos diarios en valores de hemograma completo, propiedades bioquímicas sanguíneas y temperatura corporal de bovinos Holstein.
4. Establecer asociaciones entre las variables sanguíneas que presentan un comportamiento rítmico diario.

Para ello, se formularon las siguientes hipótesis de trabajo:

1. Se presentarán variaciones cronobiológicas ajustadas a ciclos diarios en ciertas variables sanguíneas y temperatura corporal de bovinos Holstein.
2. Las variables sanguíneas y la temperatura rectal experimentarán oscilaciones diarias que se verán influenciadas por la categoría.
3. Los ritmos diarios de las variables sanguíneas y temperatura corporal de bovinos Holstein bajo sistema extensivo se verán afectadas por la época del año.
4. Las variables sanguíneas que presentan un comportamiento rítmico diario se asocian en grupos con características comunes formando conglomerados con cierto grado de homogeneidad dentro del cluster y un marcado grado de heterogeneidad con el resto.

CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Lugar de trabajo y animales

La fase experimental del presente trabajo se realizó durante los años 2002 y 2003. Se utilizaron 18 bovinos de la raza Holstein, pertenecientes a un establecimiento agropecuario ubicado en la localidad de Villa Trinidad, paralelo 19, meridiano 26, provincia de Santa Fe. Es una zona de transición entre dos grandes regiones naturales: la llanura Pampeana y la Chaqueña. Los animales fueron seleccionados al azar de una explotación lechera extensiva comercial que recibe asistencia veterinaria y asesoramiento técnico en los aspectos alimenticios, lleva control de producción oficial, registros sanitarios y reproductivos analizados por medios electrónicos, el plantel recibe servicio instrumental con semen congelado y se encuentra libre de enfermedades zoonóticas como brucelosis y tuberculosis según lo establecido en Plan Nacional de Control y Erradicación de la Brucelosis y Tuberculosis Bovina.

Los animales se dividieron en 3 grupos experimentales según las siguientes categorías:

Vaquillonas: seis hembras primera lactancia de 500 ± 25 kg de peso.

Vacas: seis hembras tercera lactancia de 550 ± 25 kg de peso.

Toros III: seis machos de 400 ± 25 kg de peso.

Las hembras pertenecientes a las dos categorías (vacas y vaquillonas) coincidían en su período gestacional y productivo; encontrándose en el invierno con gestación avanzada y en período de seca (aproximadamente 8 semanas antes de la fecha probable de parto); en la primavera a principios de la lactancia (menos de 30 días posteriores al parto), en el verano a mitad de lactación (mas de 120 días posteriores al parto) y en el otoño al final de la lactación (aproximadamente 210 días posteriores al parto). Durante la etapa de producción las hembras se ordeñaron dos veces por día, a las 05:00 y 15:00 h.

El grupo de seis toros fue utilizado con el propósito de poder evaluar el efecto estacional sobre las oscilaciones cronobiológicas de las variables sanguíneas y temperatura corporal, debido a que las hembras Holstein presentan alta producción láctea, con

un parto por año y una lactancia que comprende un período de diez meses seguido de un secado de los dos meses, resultando imposible evaluar solamente el efecto estacional ya que las variables sanguíneas se ven afectadas además por los cambios fisiológicos.

Los animales eran clínicamente sanos, se encontraban bajo sistema de manejo extensivo, permitiendo su desplazamiento a campo abierto y el pastoreo en potreros con pasturas implantadas base alfalfa, de modo que además estaban sujetos a la variación natural del ciclo luz-oscuridad. Antes de iniciar este estudio, los animales se encontraban en pasturas naturales de alfalfa. El consumo de agua fue *ad libitum*.

III.2. Condiciones del muestreo

Se llevaron a cabo cuatro controles correspondientes a las estaciones de invierno, primavera, verano y otoño. Se utilizaron los mismos animales pertenecientes a las tres categorías detalladas anteriormente.

En cada control, a cada animal durante un período de 24 h y a intervalos de 3 h, se registró la temperatura rectal y se obtuvo por punción yugular una muestra de sangre de 30 ml (576 muestras en total).

Debido a que el ciclo luz oscuridad se considera el principal sincronizador de los ritmos biológicos modificando la fase de los ritmos de muchas especies, se utiliza como parámetro de medición temporal el HALO (“hours after light onset”) para estudios cronobiológicos. Esto permite hacer comparables estudios realizados en diferentes períodos del año. Por este motivo, se eligió el comienzo de la fase de luz como referencia temporal de este trabajo.

Tabla 8. Horario meridional y su respectivo HALO para cada muestreo en las diferentes estaciones

muestreo	1		2		3		4		5		6		7		8	
	hora	HALO	hora	HALO	hora	HALO	hora	HALO	hora	HALO	hora	HALO	hora	HALO	hora	HALO
Invierno	09:45	2	12:45	5	15:45	8	18:45	11	21:45	14	00:45	17	03:45	20	06:45	23
Primavera	07:53	2	10:53	5	13:53	8	16:53	11	19:53	14	22:53	17	01:53	20	04:53	23
Verano	08:46	2	11:46	5	14:46	8	17:46	11	20:46	14	23:46	17	02:46	20	05:46	23
Otoño	09:50	2	12:50	5	15:50	8	18:50	11	21:50	14	00:50	17	03:50	20	06:50	23

La información de hora de salida, temperatura y humedad relativa fue recogida de una estación meteorológica automática ubicada en las cercanías del lugar donde se realizó el ensayo. La Tabla 9 presenta la temperatura y humedad relativa ambiente registrada en los horarios (HALO) correspondientes a los momentos de toma de muestra en las cuatro estaciones del año y el correspondiente promedio, máxima y mínima diaria.

Tabla 9. Temperatura ambiente (°C) y humedad relativa registrada en la localidad de Villa Trinidad en el período 2002-2003

HALO	Invierno 2002		Primavera 2002		Verano 2003		Otoño2003	
	Temp °C	Hum.%	Temp °C	Hum.%	Temp °C	Hum.%	Temp °C	Hum.%
2	13,4	78	23,6	76	14,6	81	9,7	100
5	20,8	40	25,4	77	19,2	65	10,9	100
8	24,0	62	29,9	48	21,1	62	11,6	85
11	17,8	68	30,8	45	18,0	78	11,3	89
14	12,2	75	27,7	63	16,6	68	10,7	92
17	4,8	83	24,8	75	14,4	83	9,9	100
20	4,4	84	23,3	81	13,3	86	9,7	99
23	5,6	87	22,6	87	10,8	91	9,2	97
8	24,0	62	29,9	48	21,1	62	11,6	85
11	17,8	68	30,8	45	18,0	78	11,3	89
Promedio	12,9	72	26,0	69	16,0	76	10,4	95
Máxima	24,0	87	30,8	87	21,1	91	11,6	100
Minima	4,4	40	22,6	45	10,8	62	9,2	85

Cada muestra fue fraccionada en dos alícuotas, en una se adicionó EDTA como anticoagulante para las determinaciones de las variables hematológicas en sangre total. La otra alícuota se dejó sin anticoagulante para la separación del suero, que se refrigeró en forma inmediata a su extracción, hasta el momento de su procesamiento, donde se procedió a la cuantificación de variables séricas.

En todas las muestras se realizaron las siguientes determinaciones:

- **Variables hematológicas:** glóbulos rojos, concentración de hemoglobina, hematócrito, glóbulos blancos, linfocitos, macrófagos, granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y plaquetas.
- **Variables bioquímicas del suero:**
 - **Electrolitos:** calcio, fósforo inorgánico, magnesio, sodio y potasio.
 - **Metabolitos:** glucosa, colesterol, triglicéridos y bilirrubina total.
 - **Componentes nitrogenados:** proteínas, albúminas, urea y creatinina.
 - **Enzimas séricas:** aspartato aminotransferasa (AST/GOT), alaninoamino transferasa (ALT/GPT), fosfatasa alcalina (FA) y amilasa.

III.3. Materiales y equipos analíticos

III.3.1. Materiales en la toma de muestra

En el muestreo en campo se utilizaron los siguientes materiales de trabajo: jeringas de 45 cm³, agujas hipodérmicas 40 x 12, gradillas, tubos de centrifuga, tubos de ensayo, tubos de hemólisis, tubos eppendorf, micropipetas regulables de 20-200 y 100-1000 µl, centrífuga CAVOUR VT 3216.

III.3.2. Equipos analíticos

Para la cuantificación de las variables fisicoquímicas sanguíneas se utilizaron los siguientes equipos analíticos:

Analizador hematológico Arcus, Diatron[®], Argentina. El análisis de las variables hematológicas en todas las muestras de sangre entera se realizó mediante un contador celular electrónico Arcus, previamente calibrado para los componentes a analizar. El principio de operación del equipo se basa en la medición de la impedancia. Este método cuenta las células detectando y midiendo los cambios en la resistencia eléctrica cuando una partícula en el líquido conductivo pasa por una apertura que posee el equipo para el muestreo. Cada célula cuando atraviesa la apertura, donde una corriente continua fluye entre los electrodos internos y externo, causa un cambio en la impedancia, modificando

la suspensión de la conductividad de la célula sanguínea. Estos cambios son registrados como aumentos en el voltaje entre los electrodos. El número de pulsos se correlaciona con el número de partículas (CBC – Contador de células sanguíneas). La intensidad de cada pulso es proporcional al volumen de dicha partícula (Histograma de glóbulos blancos, glóbulos rojos, plaquetas). Los pulsos son contabilizados solo en canales (en términos de femtolitros, fl). El programa estadístico posee incorporados los límites superior e inferior para cada componente celular.

El equipo permite además estimar los valores de hematócrito haciendo uso de los recuentos de glóbulos rojos y el valor corpuscular medio. Éste último se determina a partir del histograma de frecuencias de distribución de glóbulos rojos. En forma similar, el equipo determina las frecuencias de linfocitos, monocitos-eosinófilos y granulocitos a partir del histograma correspondiente a la distribución de frecuencias de glóbulos blancos cuantificados en los canales del equipo por los tres discriminadores de glóbulos blancos.

Para la cuantificación de hemoglobina, el equipo realiza una dilución de la muestra lisada 1:196 y mide por el método de cyanmetahemoglobina sus niveles. El reactivo lisa los glóbulos rojos liberando la hemoglobina, el hierro de la hemoglobina es convertido en ferroso (Fe^{2+}) a férrico (Fe^{3+}) para formar metahemoglobina que se combina con el cianuro de potasio (KCN) para producir la cianmetahemoglobina estable, o cianuro de hemoglobina. La concentración de hemoglobina puede ser medida también utilizando reactivos lisantes libres de cianuro.

Este equipo utiliza tres reactivos:

- Solución isotónica (Iac International, Argentina). Solución electrolítica balanceada empleada como diluyente en la determinación cuantitativa de las células sanguíneas en contador hematológico automático. Composición: NaH_2PO_4 , NaCl , K_2HPO_4 , KCl y agua.
- Solución lisante (Iac International, Argentina). Reactivo hemolizante, para la determinación cuantitativa de hemoglobina y como reactivo lisante para la cuantificación de leucocitos totales y fórmulas diferenciales en contadores

hematológicos automatizados. Composición: Sal de amonio cuaternaria, Triton y agua.

- Solución detergente (Iac International, Argentina). Empleada como agente de limpieza para contadores hematológicos automatizados. Composición: tween 20 y agua.

Analizador clínico automático Metrolab 2100 (Laboratorio Rodriguez Corswant SRL, Argentina). Se trata de un sistema multiparamétrico que permite determinar en forma simultánea hasta un máximo de 18 parámetros bioquímicos, haciendo uso de un brazo que toma las muestras en forma automática.

Para la cuantificación de los parámetros bioquímicos, el equipo trabaja con un fotolorímetro que consta de nueve filtros interferenciales con un sistema de doble haz, permitiendo obtener lecturas independientes de las fluctuaciones de la lámpara, ligeros cambios en la posición del filtro, etc.

Para cada parámetro bioquímico a cuantificar, se requieren los reactivos de trabajo específicos de cada método. Para ello, el equipo dispone de una bandeja con una capacidad de 18 reactivos de trabajo, permitiendo la determinación de hasta un máximo de 18 compuestos en forma continua.

Para la cuantificación de las variables bioquímicas evaluadas se emplearon equipos comerciales de reactivos de la marca Wiener lab., siguiendo las instrucciones y recomendaciones del laboratorio para cada uno de ellos. A continuación se detallan los principios de las técnicas analíticas utilizadas.

- **Calcio (mmol/l):** se determinó mediante reacción con la o-cresolftalein complejona a pH= 10,8 con buffer de aminometil propanol en alcohol metílico, dando un complejo de color magenta que se midió fotolorímetricamente a 570 nm.
- **Fósforo inorgánico (mmol/l):** mediante reacción en medio ácido con el molibdato para producir fosfomolibdato, que se reduce por el ácido ascórbico a azul de molibdeno, desarrollándose el color en medio arsenito/citrato. El arsenito/citrato se

combina con el exceso de molibdato impidiendo su reacción posterior con el fosfato liberado de los ésteres lábiles. El color obtenido se midió entre 620 y 650 nm.

- **Magnesio (mmol/l):** por reacción con el xylidyl blue en medio alcalino, formando un complejo de color púrpura cuya intensidad es proporcional a la concentración de magnesio en la muestra. La incorporación del complejante EDTA al reactivo elimina la interferencia de los iones calcio. El color obtenido se determinó a 520 nm.
- **Glucosa (mmol/l):** la glucosa es oxidada enzimáticamente por la glucosa oxidasa (GOD; D-glucosa oxígeno 1-óxidorreductasa) a ácido glucónico y agua oxigenada; el H_2O_2 en presencia de peroxidasa (POD; Donador: hidrógeno-peróxido óxidorreductasa) produce la copulación oxidativa de la 4-aminofenazona (4-AF) con un aceptor dando lugar a la formación de una quinonimina roja con absorbancia máxima a 505 nm.
- **Bilirrubina total (mmol/l):** mediante una reacción específica de la bilirrubina con el ácido sulfanílico diazotado que produce un pigmento color rojo-violáceo (azobilirrubina) que se valoró a 530 nm.
- **Colesterol (mmol/l):** el colesterol es oxidado enzimáticamente por la colesterol oxidasa (CHOD) previa hidrólisis enzimática de los ésteres mediante la colesterol estearasa (CHE). El agua oxigenada generada en la oxigenación, produce la copulación oxidativa de la 4-aminofenazona (4-AF) con un aceptor mediante una reacción catalizada por la peroxidasa (POD). El producto es una quinonimina roja con absorbancia máxima a 505 nm.
- **Triglicéridos (mmol/l):** Los triglicéridos reaccionan con la lipoproteína lipasa dando glicerol y ácidos grasos. El glicerol y ATP por acción de glicerol quinasa origina glicerol 1P y ADP. Luego el glicerol 1P y oxígeno catalizados por la glicerol fosfafato oxidasa genera agua oxigenada y dihidroxiacetonafofato. Por último, el agua oxigenada, la 4-aminofenazona y clorofenol reaccionan con la peroxidasa dando origen a la quinonimina roja que se determinó a 505 nm.
- **Proteínas (g/l):** los enlaces peptídicos de las proteínas reaccionan con el ion cúprico, en medio alcalino, para dar un complejo color violeta con máximo de absorción a 540 nm, cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteínas totales en la muestra.

- **Albúminas (g/l):** la albúmina reacciona específicamente con la forma aniónica de la 3,3', 5,5'-tetrabromocresolsulfonftaleína, en medio tamponado a pH 3,9. El aumento de absorbancia a 625 nm respecto al blanco de reactivo, es proporcional a la cantidad de albúmina presente en la muestra.
- **Urea (mmol/l):** la urea y el agua por acción de la ureasa genera amonio y dióxido de carbono. El amonio, NADH, H⁺ y 2-oxoglutarato catalizado por la glutamato deshidrogenasa origina L-glutamato, NAD⁺ y agua. El consumo de NADH medido por la disminución de absorbancia a 340 nm es proporcional a la concentración de urea en la muestra.
- **Creatinina (mmol/l):** por reacción con el picrato alcalino (reacción de Jaffe), en medio tamponado, previa desproteinización con ácido pícrico, obteniéndose un cromógeno rojo que se cuantificó a 500 nm.
- **Aspartato aminotransferasa (GOT/AST) (UI/ml):** L-aspartato y 2-oxoglutarato por acción enzimática de la aspartato aminotransferasa generan oxalacetato, éste con NADH e H⁺ por la catálisis de la malato deshidrogenasa origina L-malato y NAD⁺. El consumo de NADH medido por la disminución de absorbancia a 340 nm es proporcional a la concentración de GOT en la muestra.
- **Alanina aminotransferasa (GPT/ALT) (UI/ml):** L-alanina y 2-oxoglutarato por acción enzimática de la alanina aminotransferasa origina piruvato que junto al NADH y H⁺ por medio de la lactato deshidrogenasa genera L-lactato y NAD⁺. El consumo de NADH medido por la disminución de absorbancia a 340 nm es proporcional a la concentración de GPT en la muestra.
- **Fosfatasa alcalina (FA) (UI/ml):** la fosfatasa alcalina desdobla al fenilfosfato de sodio en medio alcalino tamponado con aminometil propanol. El fenol liberado se determina por reacción con 4-aminoantipirina y ferricianuro como agente oxidante. El color desarrollado es directamente proporcional a la actividad enzimática y se midió a 520 nm.
- **Amilasa (UI/ml):** la alfa amilasa hidroliza el sustrato definido 2-cloro-p-nitrofenil-alfa-D-maltotriósido (CNP-G3) para liberar 2-cloro-p-nitrofenol (CNP), formándose 2-cloro-nitrofenil-alfa-D-maltósido (CNP-G2), maltotriosa (G3) y glucosa. El CNP

absorbe a 405 nm y la velocidad de aparición del color es directamente proporcional a la actividad enzimática.

Fotómetro de llama modelo Crudo Ionometer (Laboratorios Norte SRL, Argentina). El fundamento del método de análisis de este equipo se basa en la espectrometría de emisión atómica de llama, que se origina por la excitación sufrida por los electrones de un átomo al aplicarles una fuente de energía térmica procedente de la combustión de una llama. Los metales tienen la propiedad de dar una coloración específica a la llama al ser ionizados en una fuente de calor intenso. Dicha ionización, produce un espectro de líneas características de cada ion metal que está excitado. Por ej. el Na^+ a 598,3 nm y el K^+ a 766,5 nm. Esta propiedad espectrofotométrica, se aprovecha para el análisis cuantitativo de los metales, por cuanto la intensidad del brillo de la línea, es proporcional a su cantidad.

Las concentraciones de sodio y potasio (mmol/l) se determinaron mediante fotometría de llama calibrado con estándar Na/K de 140/5 mmol/l. Para el sodio se efectuó una dilución 1:400 y posterior lectura con filtro de 598 nm, mientras que la determinación de potasio requirió de una dilución 1:200 y el empleo de filtro de 766,5 nm para su lectura.

Termómetro digital FURER[®], (Argentina). La temperatura corporal se determinó por vía rectal utilizando un termómetro corporal digital con pantalla LCD. Su rango de medición es de 32,0°C - 42,9°C y su precisión es de $\pm 0,1^\circ\text{C}$ entre 34,0°C y 42,0°C, a temperatura ambiente normal entre 18,0 y 28,0 °C. Provee lecturas rápidas en aproximadamente 30 segundos y emite una señal sonora aproximadamente 10 segundos después de haber llegado a la temperatura máxima.

III.4. Métodos de análisis estadístico

III.4.1. Análisis de la varianza con mediciones repetidas

Por tratarse de grupos de animales que fueron muestreados a diferentes momentos, se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) para muestras repetidas, mediante la opción REPEATED del procedimiento GLM (General Linear Model) contenido en el paquete estadístico SAS[®].

El modelo estadístico para el análisis de los ciclos circadianos fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + [H]_i + [EA]_I + [C]_j + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = variable dependiente; μ = media general; $[H]_i$ = efecto HALO ($i = 8$: 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23); $[EA]_I$ = efecto estación del año ($i = 4$: invierno, primavera, otoño y verano); $[C]_j$ = efecto categoría ($j = 3$: vacas 1ra lactancia, vacas 3ra lactancia y toros); ε_{ijk} = error residual del modelo.

III.4.2. Ajuste a series de temporales

Los datos correspondientes a las variables que presentaron variaciones diarias (efecto HALO) significativos, se sometieron al análisis de series temporales.

La existencia de la forma periódica y su caracterización se realizó siguiendo el análisis armónico o desarrollo de Fourier. El análisis estadístico fue llevado a cabo utilizando el modelo de regresión no lineal NLIN del SAS[®], con la metodología de Gauss-Newton para obtener el primer término de la serie de Fourier

El modelo para el ajuste de datos a una función cosenoidal fue el siguiente:

$$y_i = A_0 + A_1 * \text{Cos}(w * t + \Phi)$$

Donde:

y_i : = es el valor del i -ésimo punto de la serie de datos de N puntos; A_0 = mesor; A_1 = amplitud; w = frecuencia angular; t = tiempo expresado en HALO y Φ = acrofase.

Como parámetro de ajuste del modelo se utilizó el coeficiente de regresión ajustado (R), que se determinó como la raíz cuadrada del cociente entre la varianza explicada por el modelo cosenoidal dividida la media de error cuadrático.

Para la construcción del gráfico polar se ubicó en primer lugar el centro de cada elipse en coordenadas paramétricas donde:

$$X_0 = A_1 * \text{sen } \Phi \quad \text{y} \quad Y_0 = A_1 * \text{cos } \Phi$$

Los puntos pertenecientes a las elipses que abarcan el intervalo de confianza del 95 % fueron representados en coordenadas paramétricas según:

$$x = x_0 + \frac{ES\Phi}{24} * A_1 * \text{cos } t * \text{cos } \Phi - \frac{ES}{24} * A_1 * \text{sen } t * \text{sen } \Phi$$

$$y = y_0 + \frac{ES\Phi}{24} * A_1 * \text{cos } t * \text{sen } \Phi - \frac{ES}{24} * A_1 * \text{sen } t * \text{cos } \Phi$$

Donde:

A_1 = amplitud; Φ = acrofase; $ES A_1$ = error Standard de la amplitud correspondiente a un intervalo de confianza del 95 %; $ES \Phi$ = error Standard de la acrofase correspondiente a un intervalo de confianza del 95 % y t = tiempo expresado en HALO.

III.4.3. Análisis Cluster

III.4.3.1. Generalidades del Análisis Cluster

Bajo el nombre de Análisis Cluster se incluyen una serie de técnicas estadísticas multivariantes que persiguen como objetivo agrupar variables (o individuos) en grupos con características comunes. De este modo, se forman conglomerados de variables (o individuos) con elevado grado de homogeneidad dentro del cluster y un marcado grado de heterogeneidad con los cluster de los demás individuos (o variables).

Por tratarse de una técnica de interdependencia, el Análisis Cluster resulta un procedimiento similar al Análisis Factorial, ya que el primero agrupa individuos, mientras que el segundo agrupa variables, aunque el Análisis Cluster también se puede utilizar para asociar variables.

Al igual que el Análisis Factorial, el Análisis Cluster se emplea con fines exploratorios y no permite hacer inferencias. Por ello, los usos más frecuentes de esta técnica multivariante son la descripción de una taxonomía, la simplificación de datos y la identificación de relaciones entre las variables (o individuos).

Esta técnica, al igual que el Análisis Factorial, no es un procedimiento inferencial, por lo que no será necesario verificar los supuestos de normalidad, homocedasticidad y linealidad. Por el contrario, se ve muy influenciada por la multicolinealidad de las variables, siendo necesario eliminar las variables que presenten elevados coeficientes de correlación o utilizar una distancia como la distancia de Mahalanobis. Otra alternativa es aplicar una Análisis Factorial de Correlaciones a los datos en una primer etapa y emplear después el Análisis Cluster a las nuevas variables factoriales.

Hay que destacar que el Análisis Cluster depende en forma muy acentuada de las variables incorporadas para establecer las similitudes de los grupos, siendo muy sensible a la "incorporación" o "eliminación" de variables relevantes (Hair y col., 1999).

En este sentido, cuando se diseña un trabajo de investigación, se deberá tener un cuidado especial en las variables a incorporar, haciendo uso de las consideraciones teóricas, conceptuales y prácticas que se disponga sobre el tema. Se deberá incluir únicamente aquellas variables que caracterizan a los individuos, ya que el procedimiento estadístico no dispone de herramientas como para seleccionar aquellas variables relevantes.

Antes de aplicar el Análisis Cluster, deberán estandarizarse o tipificarse las mediciones de cada variable, ya que la aplicación de esta técnica a datos no estandarizados mostrará inconsistencia entre los resultados de los diferentes análisis

ensayados.

Para determinar los aglomerados o cluster, se deberán establecer los criterios de "similitud" y "formación de los aglomerados". Entre las distancias más utilizadas como criterio de similitud se pueden mencionar la distancia Euclídea, Euclídea cuadrática, distancia Manhattan, distancia de Mahalanobis y coeficientes de correlación como medida de similitud, entre otras.

Debido a que la aplicación de diferentes medidas de similitud llevará a diferentes resultados, será conveniente utilizar distintos tipos de medidas y comparar los resultados con los fundamentos teóricos y prácticos que se dispone sobre el tema, eligiendo aquella medida de similitud que permite obtener un cluster coherente con los fundamentos teóricos. En este sentido, Hair y col. (1999) considera que el Análisis Cluster junto al Análisis Factorial es más un arte que una ciencia.

Para la formación de conglomerados el procedimiento más utilizado permite establecer los grupos mediante la asociación de aquellos individuos que presentan menor distancia, o sea, los más cercanos. A este tipo de procedimiento se lo denomina Análisis Cluster Jerárquico.

Un tema que merece una especial atención en el momento de aplicar el Análisis Cluster es el número de aglomerados a considerar una vez realizados los cálculos y construido el dendograma. Se trata pues de establecer una relación de compromiso entre la homogeneidad de cada cluster y el número de aglomerados, ya que un número muy reducido de cluster formaría pocos grupos de variables heterogéneos, mientras que un número elevado de cluster crearía un elevado grado de discriminación entre las variables de cada grupo.

Por tratarse de una decisión "subjetiva", el criterio más adecuado lo establecerá el investigador, ya que él podrá determinar el número de cluster aceptable acorde a su experiencia y los fundamentos teóricos disponibles.

Una vez obtenidos los aglomerados, deben ser examinados minuciosamente, y asignarle a cada aglomerado una "etiqueta" que describa su naturaleza, acorde a la base conceptual o de una experiencia práctica.

III.4.3.2. Asociación de los ritmos biológicos por Análisis Cluster

A modo de síntesis, y con el propósito de establecer asociaciones entre las variables sanguíneas que presentaron un comportamiento rítmico, se ha empleado el análisis cluster como técnica estadística multivariante.

Para establecer las relaciones entre las variables sanguíneas que presentaron ritmos biológicos se utilizó la distancia Ward's como medida de similitud y la distancia euclídea cuadrática para la constitución de los aglomerados.

Este procedimiento se aplicó a las diferentes categorías (vaquillonas, vacas y toros) de bovinos Holstein, con el propósito de corroborar comportamientos similares entre las variables.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. VARIABLES HEMATOLÓGICAS

Para estudiar los efectos de la categoría (toros, hembras 1ra lactancia y hembras 3ra lactancia), estación y HALO sobre las variables hematológicas, se aplicó un ANOVA-MR. Los valores de “F” y probabilidad "p" para cada factor se resumen en Tabla 10.

Tabla 10. Resultados del ANOVA que expresan los efectos de la categoría de bovinos, estación y HALO sobre las variables hematológicas

Variable Hematológica	Efectos					
	Categoría		Estación		HALO	
	Valor “F”	Valor “p”	Valor “F”	Valor “p”	Valor “F”	Valor “p”
Eritrocitos	114,07	0,0001	109,54	0,0001	1,82	0,0414
Hemoglobina	14,64	0,0001	181,97	0,0001	2,88	0,0061
Hematocrito	31,04	0,0001	51,86	0,0001	4,85	0,0114
Leucocitos	85,99	0,0001	6,76	0,0002	1,80	0,1802
Linfocitos	52,86	0,0001	5,08	0,0018	2,09	0,1489
Monocitos	3,29	0,7499	9,36	0,0001	0,10	0,7499
Granulocitos	57,00	0,0001	3,10	0,0263	0,79	0,3760
Plaquetas	27,34	0,0821	27,34	0,0001	3,03	0,0821

Los valores resumidos en esta Tabla ponen de manifiesto que la estación del año afectó en forma significativa ($p < 0,05$) a todos los elementos figurados de la sangre, en forma similar al factor categoría que mostró efecto significativo sobre todos los elementos a excepción de monocitos y plaquetas. Con respecto al factor HALO, su efecto resultó significativo ($p < 0,05$) solamente para glóbulo rojo, hemoglobina y hematocrito, variables altamente relacionadas entre sí.

La Tabla 11 resume los valores medios y desviaciones standard de las variables hematológicas de bovinos adultos estudiados, expresados en unidades del Sistema

Internacional de Medidas (SIM) según Doxey (1977). Además, se observa el efecto categoría y estación del año sobre estas variables.

Los valores de las variables hematológicas analizadas presentaron diferencias entre las diferentes categorías y estaciones del año dentro de los rangos de referencia considerados normales por Meyer y Harvey (2000) para bovinos adultos.

Saba y col. (1987) y Deputa y Dorynek (1993) reportan que las diferencias estacionales en el número de glóbulos rojos, glóbulos blancos y la concentración de hemoglobina son débiles y no dependen del estado fisiológico del bovino. Por otra parte, en un estudio realizado con hembras bovinas, Jonkisz (1999) indica que el número de glóbulos rojos en el transcurso de la gestación disminuye levemente, aumentando en el parto, para alcanzar luego valores normales. Durante la lactación de las vacas, este autor destaca una leve anemia alimentaria a consecuencia de la gran producción. De igual forma, en el presente estudio, se observó que las hembras presentaron valores más bajo de eritrocitos, contenido de hemoglobina y hematocrito en primavera con respecto a las demás estaciones del año. Este hecho podría deberse al estado productivo en que se encontraban los animales (primera fase de la curva de lactación) o bien a un efecto estacional puesto que el eritrograma de los toros (grupo testigo) presentó similar comportamiento.

Debido a que los valores de eritrocitos, hemoglobina y hematocrito exhibieron efecto significativo para HALO, categoría y estación, los ajustes cosenoidales se aplicaron a los tres grupos de 6 animales en cada estación del año (en total 12 análisis en series temporales). En Tabla 12, Tabla 13 y Tabla 14 se presentan los parámetros rítmicos correspondientes a eritrocito, hemoglobina y hematocrito, respectivamente, clasificados según las estaciones y categorías de animales.

Tabla 11. Principales parámetros estadísticos de las variables hematológicas para diferentes categorías de bovinos y estaciones del año

Variable hematológica	Estación	Vaquillonas		Vacas		Toros	
		X	DS	X	DS	X	DS
Eritrocitos (x 10 ¹² /l)	Invierno	7,65 ^a _a	0,56	7,50 ^a _a	0,45	8,02 ^b _a	0,82
	Primavera	6,70 ^a _b	0,32	5,97 ^b _b	0,48	7,52 ^c _b	0,65
	Verano	7,59 ^a _a	0,60	6,99 ^b _c	0,56	8,31 ^c _a	0,73
	Otoño	7,20 ^a _c	0,55	7,18 ^a _c	0,61	8,03 ^b _a	0,95
Hemoglobina (g/l)	Invierno	12,79 ^a _a	0,94	12,62 ^a _a	0,79	12,12 ^a _a	0,78
	Primavera	10,31 ^a _b	0,57	10,08 ^a _b	0,97	11,21 ^b _b	0,59
	Verano	11,51 ^a _c	0,61	10,86 ^b _c	1,04	12,05 ^c _a	0,92
	Otoño	10,51 ^a _b	0,58	10,66 ^a _c	1,02	11,17 ^b _b	0,54
Hematocrito (%)	Invierno	37,00 ^a _a	2,09	37,18 ^a _a	2,71	36,15 ^a _a	3,12
	Primavera	32,09 ^a _b	1,86	31,46 ^a _b	3,28	35,14 ^b _b	2,03
	Verano	34,63 ^a _c	1,94	33,22 ^b _c	3,88	36,82 ^c _a	2,66
	Otoño	33,25 ^a _d	1,83	33,67 ^a _c	3,42	35,55 ^b _{ba}	1,71
Leucocitos (x 10 ⁹ /l)	Invierno	9,48 ^a _a	4,61	7,09 ^b _a	2,36	6,68 ^b _a	1,99
	Primavera	11,39 ^a _b	4,40	7,21 ^b _a	2,21	7,64 ^b _b	2,25
	Verano	9,56 ^a _a	3,90	6,15 ^b _b	1,44	6,68 ^b _a	1,61
	Otoño	11,63 ^a _b	5,02	7,33 ^b _a	1,53	7,16 ^b _{ab}	1,75
Linfocitos (x 10 ⁹ /l)	Invierno	5,41 ^a _a	4,13	4,00 ^b _a	3,48	2,63 ^c _a	1,20
	Primavera	6,57 ^a _a	2,53	4,11 ^b _{ab}	1,67	4,29 ^b _b	2,03
	Verano	5,64 ^a _a	4,05	2,96 ^b _b	1,18	3,42 ^b _b	1,46
	Otoño	7,57 ^a _b	4,92	3,84 ^b _{ab}	1,58	4,02 ^b _b	1,59
Monocitos (x 10 ⁹ /l)	Invierno	0,93 ^a _a	0,85	0,59 ^b _{ab}	0,46	0,80 ^{ab} _a	0,51
	Primavera	0,65 ^a _b	0,53	0,54 ^a _b	0,33	0,68 ^a _{ab}	0,38
	Verano	0,33 ^a _b	0,42	0,44 ^{ab} _b	0,33	0,55 ^b _{ab}	0,42
	Otoño	0,83 ^a _a	0,52	0,70 ^b _a	0,37	0,48 ^c _b	0,34
Granulocitos (x 10 ⁹ /l)	Invierno	3,14 ^a _a	0,62	2,50 ^b _{ab}	0,41	3,25 ^c _a	0,53
	Primavera	4,17 ^a _{ab}	1,39	2,55 ^b _b	0,88	2,68 ^b _b	0,90
	Verano	3,59 ^a _b	1,28	2,76 ^b _a	0,70	2,72 ^b _a	0,72
	Otoño	3,24 ^a _{ab}	1,00	2,79 ^b _a	0,74	2,66 ^b _{ab}	0,53
Plaquetas (x 10 ⁹ /l)	Invierno	245,38 ^a _a	116,47	207,00 ^a _a	129,17	361,67 ^b _a	188,94
	Primavera	214,68 ^a _a	109,34	249,96 ^a _a	121,86	375,21 ^b _a	169,17
	Verano	377,41 ^a _b	140,15	345,67 ^{ab} _b	104,60	394,47 ^a _a	172,56
	Otoño	346,60 ^a _b	206,54	408,58 ^{ab} _c	142,77	473,46 ^b _b	206,10

^{a, b, c,} Diferentes superíndices para valores medios de una misma fila indican diferencias significativas a un nivel de $p < 0,05$

^{a, b, c, d,} Diferentes subíndices para valores medios de una misma columna indican diferencias significativas a un nivel de $p < 0,05$, para cada variable hematológica.

Tabla 12. Parámetros estadísticos que expresan los modelos rítmicos diarios de los niveles de eritrocitos en sangre de bovinos Holstein

		Eritrocitos = $A_0 + A_1 * \text{Cos} (w * t + \Phi)$									
Estación	Categoría	A_0		A_1		W		Φ		R	
		X	ES	X	ES	X	ES	X	ES		
Invierno	Vaquillona	7,648	0,016	0,169	0,023	0,038	0,004	05:53	01:30	0,97	
	Vaca	7,497	0,042	0,236	0,063	0,048	0,005	07:05	01:52	0,88	
	Toro	8,024	0,075	0,459	0,112	0,051	0,004	07:38	01:25	0,90	
Primavera	Vaquillona	6,697	0,028	0,069	0,042	0,050	0,011	07:43	03:24	0,63	
	Vaca	5,971	0,025	0,080	0,036	0,056	0,009	07:59	02:23	0,75	
	Toro	7,469	0,126	0,232	0,101	0,031	0,015	08:41	04:79	0,85	
Verano	Vaquillona	7,658	0,208	0,272	0,171	0,032	0,020	07:06	09:90	0,81	
	Vaca	6,984	0,060	0,277	0,081	0,043	0,007	04:55	02:54	0,87	
	Toro	8,288	0,081	0,203	0,113	0,055	0,012	06:17	02:89	0,67	
Otoño	Vaquillona	7,200	0,042	0,201	0,051	0,041	0,007	03:52	02:77	0,89	
	Vaca	7,158	0,045	0,251	0,064	0,054	0,005	06:22	01:32	0,89	
	Toro	8,033	0,022	0,136	0,032	0,043	0,005	05:37	01:79	0,91	

A_0 ; $A_1=10^{12}/l$; $w=1/h$; $t=h$; $\Phi=h$

X: Media muestral, ES: Error Standard, R: coeficiente de correlación del modelo.

Tabla 13. Parámetros estadísticos que expresan los modelos rítmicos diarios de los niveles de hemoglobina en sangre de bovinos Holstein

		Hemoglobina = $A_0 + A_1 * \text{Cos} (w * t + \Phi)$									
Estación	Categoría	A_0		A_1		W		Φ		R	
		X	ES	X	ES	X	ES	X	ES		
Invierno	Vaquillona	12,771	0,029	0,515	0,041	0,038	0,002	06:10	00:77	0,99	
	Vaca	12,622	0,046	0,538	0,068	0,043	0,003	06:55	00:84	0,97	
	Toro	12,112	0,033	0,406	0,049	0,047	0,002	06:21	00:73	0,97	
Primavera	Vaquillona	10,310	0,042	0,152	0,062	0,050	0,007	07:47	02:17	0,77	
	Vaca	10,072	0,040	0,257	0,059	0,050	0,004	07:01	01:21	0,91	
	Toro	11,200	0,035	0,327	0,051	0,052	0,003	07:10	00:80	0,95	
Verano	Vaquillona	11,521	0,091	0,229	0,108	0,037	0,015	03:55	06:28	0,73	
	Vaca	10,876	0,097	0,238	0,101	0,034	0,015	03:13	07:00	0,77	
	Toro	12,051	0,061	0,228	0,091	0,045	0,008	07:37	02:41	0,79	
Otoño	Vaquillona	10,497	0,019	0,106	0,027	0,054	0,005	06:23	01:34	0,89	
	Vaca	10,632	0,097	0,230	0,123	0,050	0,015	04:26	04:15	0,69	
	Toro	11,179	0,040	0,192	0,052	0,045	0,007	09:11	01:90	0,88	

A_0 ; $A_1=10^{12}/l$; $w=1/h$; $t=h$; $\Phi=h$

X: Media muestral, ES: Error Standard, R: coeficiente de correlación del modelo.

Tabla 14. Parámetros estadísticos que expresan los modelos rítmicos diarios de los valores de hematocrito en sangre de bovinos Holstein

		Hematocrito = $A_0 + A_1 * \text{Cos} (w * t + \Phi)$									
Estación	Categoría	A_0		A_1		W		Φ		R	
		X	ES	X	ES	X	ES	X	ES		
Invierno	Vaquillona	36,977	0,129	1,123	0,175	0,039	0,004	07:13	01:33	0,96	
	Vaca	37,205	0,257	1,260	0,372	0,045	0,006	08:13	01:87	0,87	
	Toro	36,207	0,258	1,670	0,379	0,053	0,004	08:19	01:17	0,91	
Primavera	Vaquillona	32,131	0,173	0,596	0,252	0,051	0,008	08:55	02:34	0,77	
	Vaca	31,533	0,282	0,957	0,394	0,061	0,009	09:14	02:31	0,78	
	Toro	35,172	0,179	0,908	0,259	0,056	0,005	08:28	01:46	0,87	
Verano	Vaquillona	34,607	0,331	1,181	0,382	0,043	0,010	03:36	03:48	0,87	
	Vaca	33,079	0,295	1,956	0,422	0,049	0,004	05:52	01:30	0,92	
	Toro	36,785	0,144	0,716	0,212	0,050	0,006	06:27	01:64	0,86	
Otoño	Vaquillona	33,248	0,117	0,807	0,173	0,043	0,005	06:02	01:60	0,92	
	Vaca	33,501	0,203	1,357	0,280	0,061	0,005	06:57	01:01	0,93	
	Toro	35,548	0,152	0,713	0,220	0,042	0,007	02:23	02:24	0,86	

A_0 ; $A_1=10^{12}/l$; $w=1/h$; $t=h$; $\Phi=h$

X: Media muestral, ES: Error Standard, R: coeficiente de correlación del modelo.

A partir de dichos parámetros se construyeron las Figura 3 (eritrocito), Figura 4 (hemoglobina) y Figura 5 (hematocrito) donde se visualizan las variaciones rítmicas ajustadas por el modelo de regresión no lineal y los valores medios calculados para cada HALO, en las diferentes categorías de animales y estaciones del año.

Los elevados valores de los coeficientes de concordancia (R), que se encuentran comprendidos entre 0,63 y 0,97, indican el adecuado ajuste logrado mediante la aplicación del modelo cosenoidal, para todas las categorías y estaciones.

A partir de las frecuencias de Tabla 12, 13 y 14, se calcularon los valores de los períodos (T) que se resumen en Tabla 15. Se puede notar que el número de eritrocitos circulantes, la concentración de hemoglobina y el hematocrito presentan una frecuencia próxima a la diaria, con un período comprendido entre 20 y 28 h en la mayoría de los casos. Este hecho se puede visualizar además en las Figura 3, Figura 4 y Figura 5.

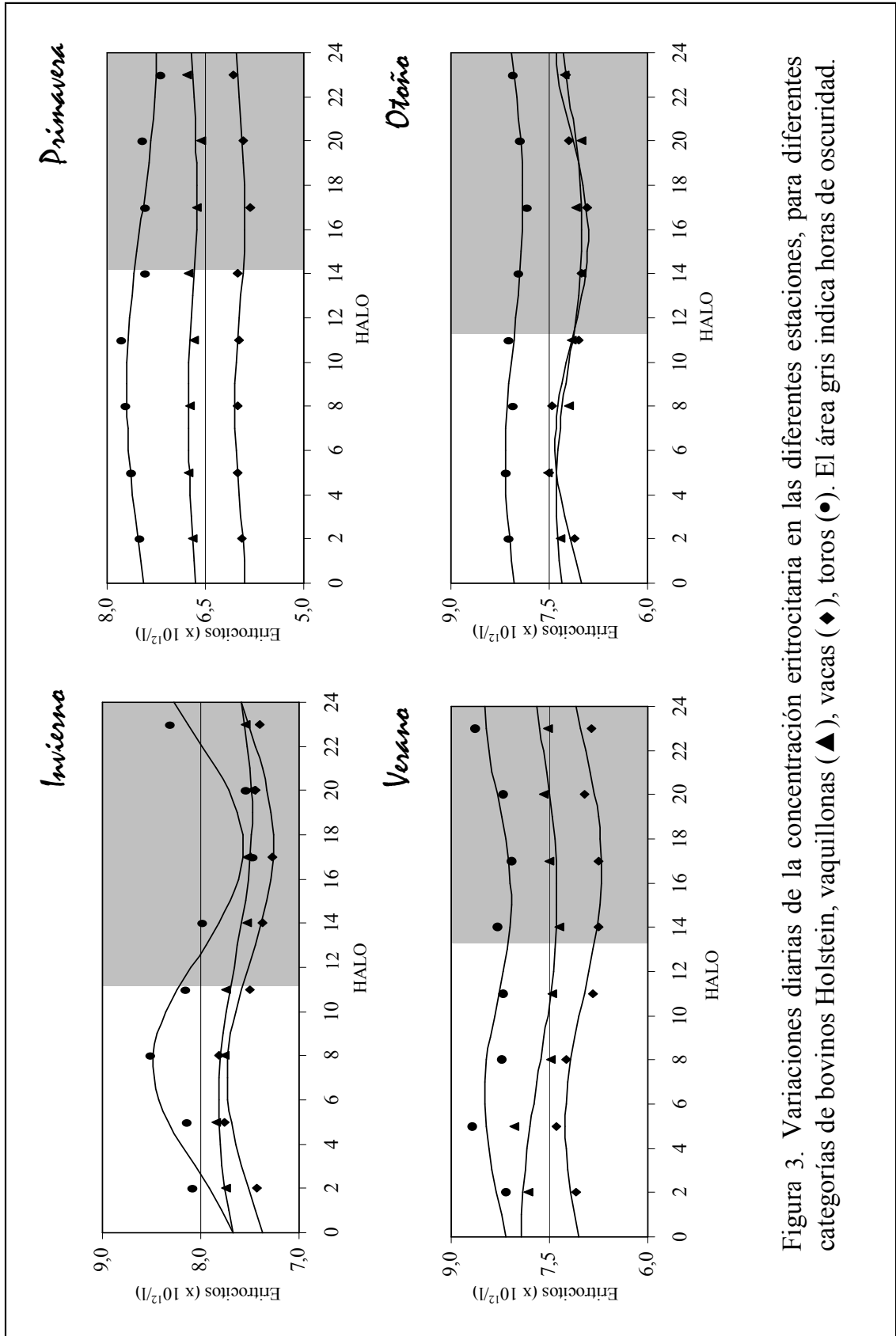


Figura 3. Variaciones diarias de la concentración eritrocitaria en las diferentes estaciones, para diferentes categorías de bovinos Holstein, vaquillonas (\blacktriangle), vacas (\blacklozenge), toros (\bullet). El área gris indica horas de oscuridad.

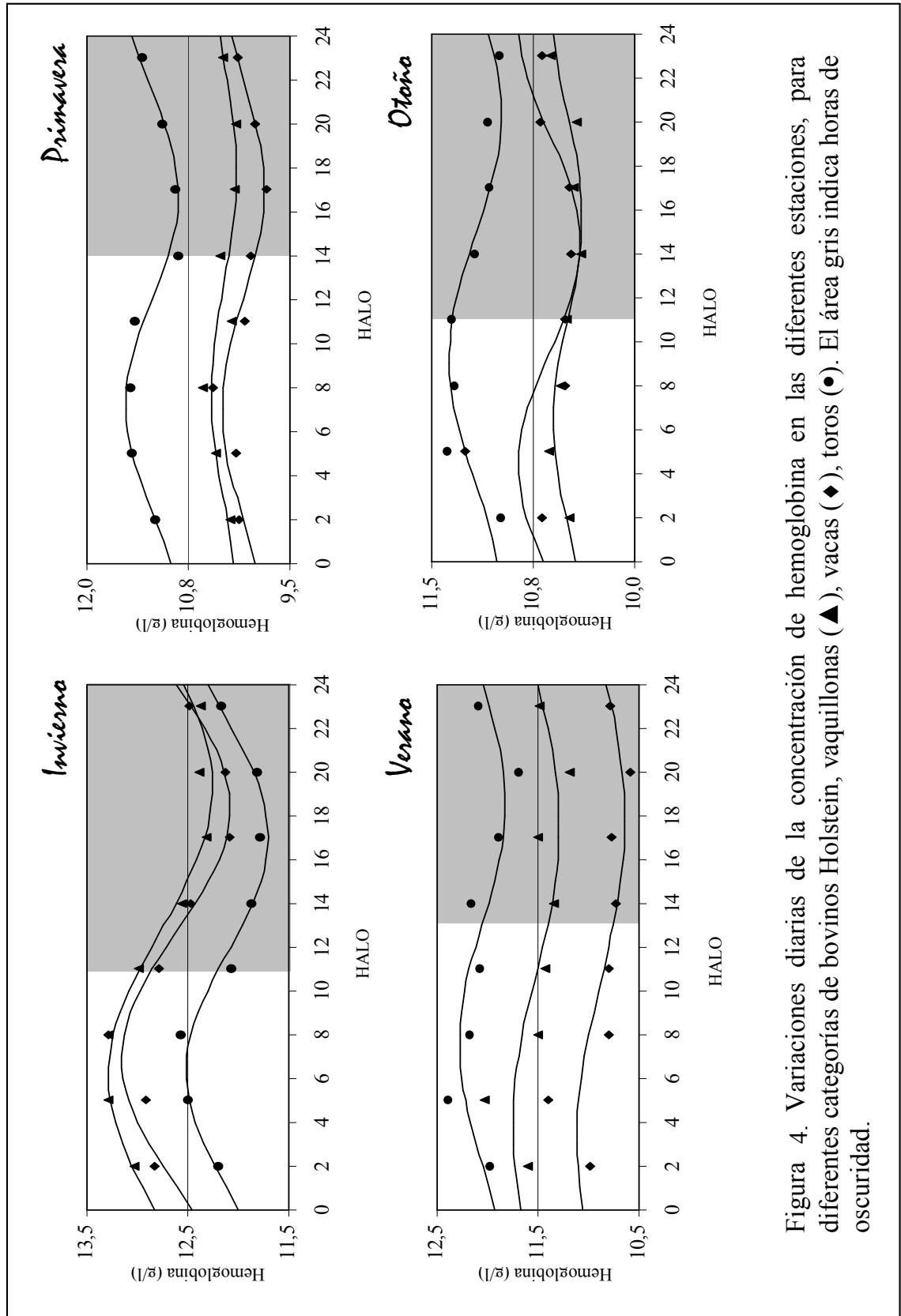


Figura 4. Variaciones diarias de la concentración de hemoglobina en las diferentes estaciones, para diferentes categorías de bovinos Holstein, vaquillonas (▲), vacas (◆), toros (●). El área gris indica horas de oscuridad.

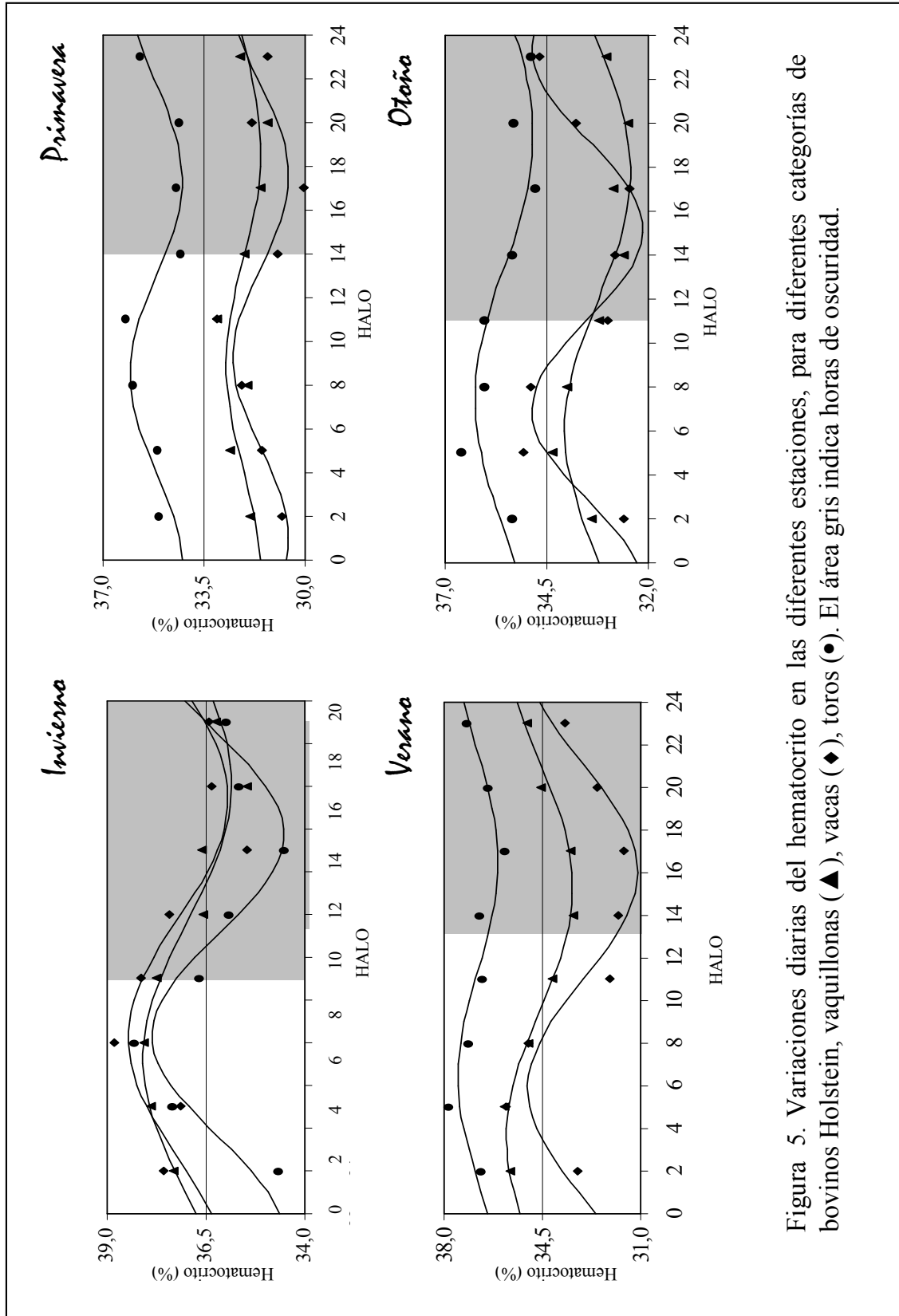


Figura 5. Variaciones diarias del hematocrito en las diferentes estaciones, para diferentes categorías de bovinos Holstein, vaquillonas (▲), vacas (●), toros (◆). El área gris indica horas de oscuridad.

Tabla 15. Valores medios de los períodos de los ritmos de eritrocitos, hemoglobina y hematocrito en sangre de bovinos Holstein

		Invierno	Primavera	Verano	Otoño
Eritrocitos	Vaquillona	26:10	20:11	31:24	24:32
	Vaca	21:00	17:44	23:31	18:25
	Toro	19:34	31:53	18:03	23:10
Hemoglobina	Vaquillona	26:30	20:08	27:18	18:35
	Vaca	23:00	20:00	29:13	20:04
	Toro	21:26	19:09	22:02	22:26
Hematocrito	Vaquillona	25:38	19:30	33:24	23:31
	Vaca	22:26	16:32	20:19	16:24
	Toro	18:48	17:44	20:04	24:04

Debido a la estrecha relación existente entre los niveles de los recuentos eritrocitarios, hemoglobina, y hematocrito, la discusión de estos tres parámetros se realizará en forma conjunta.

Las diferencias halladas en los períodos para diferentes categorías y estaciones del año podrían atribuirse al hecho que la duración de los mismos se halla íntimamente relacionada con las señales del ambiente. Según Bitman y col. (1984), el fotoperíodo, la intensidad lumínica, la temperatura ambiente, los cambios de humedad, temperatura y la presión atmosférica que caracterizan a las estaciones del año, pueden afectar la ritmicidad de ciertas propiedades del ganado lechero. Se debe destacar que las señales ambientales permiten que el período y la fase del ritmo biológico se ajusten a cada día, mes o año, que se analice, fenómeno que se conoce como sincronización (Gruart y col., 2002).

En virtud que los tamaños de las amplitudes de los ritmos de estas tres variables son pequeños, no presentan importancia desde el punto de vista del diagnóstico clínico, ya que los valores que alcanzan en las diferentes horas del día no pueden llegar a confundirse con casos patológicos asociados a anemias (batifase) o policitemia (acrofase), como ejemplo. No por ello, estas variaciones rítmicas dejan de tener importancia desde el punto de vista fisiológico.

Con respecto a las acrofases observadas para los recuentos de glóbulos rojos, hematocrito y hemoglobina, puede apreciarse que tuvieron lugar durante la fase fótica, siendo similar en todas las categorías de animales y en las cuatro estaciones, debido probablemente a la considerable influencia del ciclo luz oscuridad sobre la actividad eritropoyética medular (Haus, 1994).

En la bibliografía disponible sobre bovinos, existen estudios referentes a variables hematológicas, pero no se han encontrado análisis cronohematológicos similares a este trabajo para contrastar los resultados, por ello la discusión se realizará estableciendo similitudes con otras especies.

Coincidente con estos hallazgos, estudios efectuados en personas clínicamente sanas mostraron ritmos diarios en diferentes variables hematológicas (glóbulos rojos, hemoglobina y hematocrito) con acrofases diurnas (Touitou y col., 1979; Swoyer y col., 1989; Haus, 1994).

Piccione y col. (2001a) al evaluar las variaciones diarias de los componentes hematológicos en equinos, observaron que la acrofase de los glóbulos rojos también se presentó durante las horas de luz. Contrariamente a estas coincidencias, Sanni y col. (2000) señalan que las ratas presentan oscilaciones diarias en los niveles de glóbulos rojos con un incremento gradual desde las 12:00 h hasta las 24:00 h (acrofase a las 21:00 h). La diferencia en el comportamiento rítmico de estos roedores nocturnos en comparación con las otras especies antes mencionadas puede atribuirse a los diferentes hábitos de actividad reposo, ya que las primeras especies son de actividad diurna, a diferencia de estas ratas que son nocturnas.

Estudios sobre el comportamiento rítmico de variables sanguíneas en pollos, revelaron una tendencia opuesta en las variaciones diarias entre glóbulos blancos por un lado y glóbulos rojos, PCV y hemoglobina por el otro (Durotoye y col., 2000).

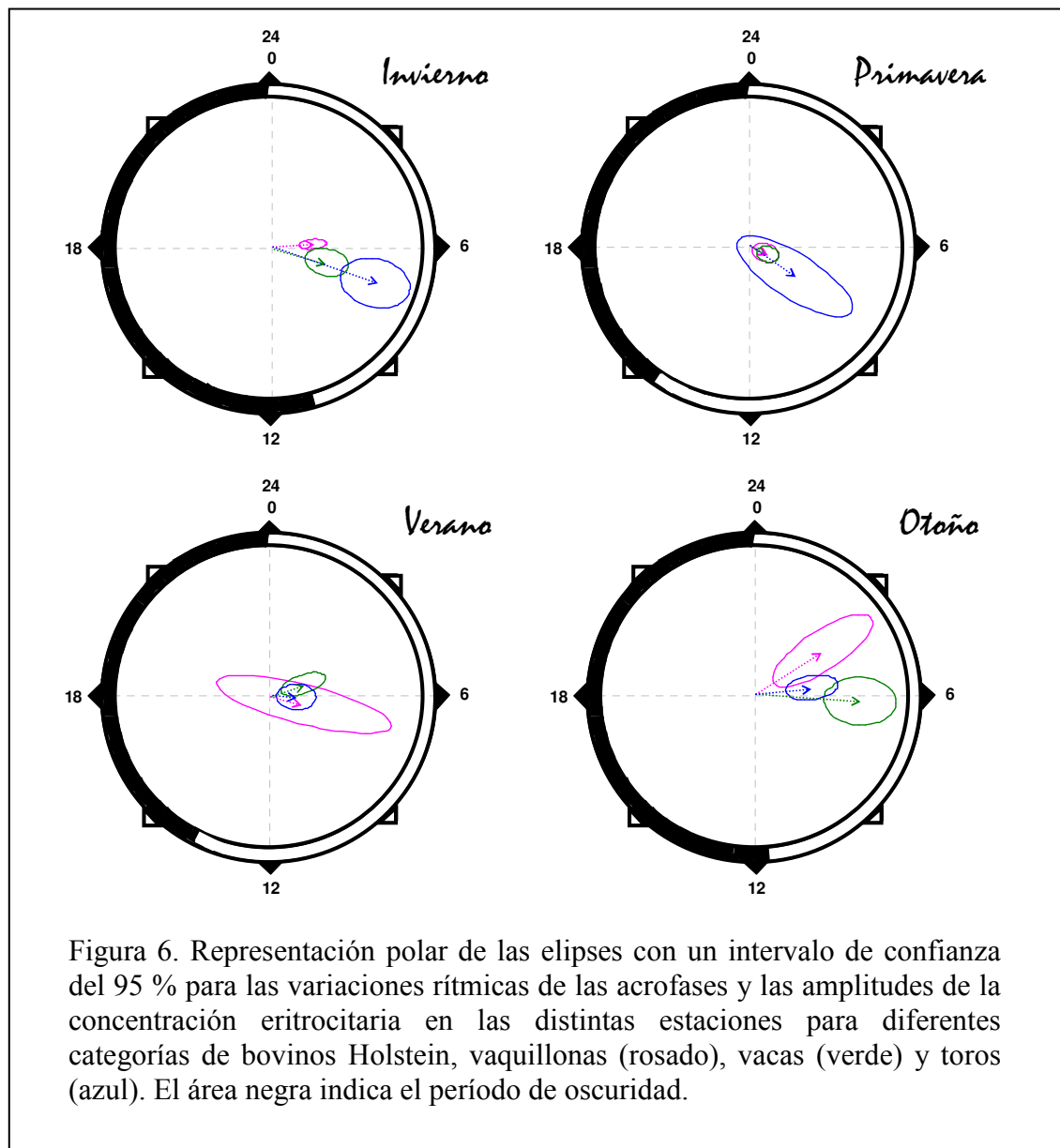
Con el propósito de sintetizar en forma clara y sencilla la distribución de las amplitudes y acrofases para cada estación del año y por categoría, se construyeron las gráficas polares Figura 6 (eritrocito), Figura 7 (hemoglobina) y Figura 8 (hematocrito).

Cada punto del plano queda determinado perfectamente mediante un radio vector cuya longitud es proporcional a la amplitud del ritmo (A_1) y un ángulo que apunta a HALO correspondiente a la acrofase (Φ). El círculo corresponde a un reloj donde la hora “0” se encuentra en el extremo superior, distribuyendo las 24 horas diarias en un ángulo de un giro (360°) según el sentido horario.

El gráfico polar permite además de ubicar las medias de las amplitudes y acrofases de cada estación, construir elipses de intervalos de confianza del 95 % con centro en los parámetros A y Φ . Cada elipse posee diámetros determinados por los intervalos de confianza del 95 % para la amplitud y acrofase. La construcción de estas elipses permite decidir la existencia de ritmos estadísticamente significativos, ya que la inclusión del origen de coordenadas del gráfico polar, estaría denotando la posibilidad que no exista ritmo. Este hecho podría atribuirse a una gran variabilidad por parte de los datos (elevados errores standard que incluyen al cero), un escaso número de individuos utilizados en el experimento (en tal caso debería repetirse el trabajo empleando mayor cantidad de unidades experimentales) o la modelación de ruidos ajenos que nada tiene que ver con la presencia de variaciones cíclicas.

Por último, la construcción de múltiples elipses en un mismo gráfico polar, permite comparar variaciones cíclicas obtenidas en diferentes condiciones (por ejemplo distintas categorías o estaciones del año). En efecto, en caso que las elipses no se intercepten, se pondría de manifiesto que se pueden establecer diferencias significativas con un intervalo de confianza del 95 % en las variaciones rítmicas de los grupos a comparar. Por el contrario, cuando se presenta superposición entre las elipses, no se podrá afirmar con un 95 % de confianza que existan diferencias significativas entre los grupos representados.

Con respecto a los eritrocitos en la Figura 6 se puede observar que no existen diferencias significativas (intervalo de confianza 95%) en la expresión de la acrofase y amplitud entre las distintas categoría en las cuatro estaciones del año, debido a que las elipses de estas se tocan o interceptan. Además se aprecia en toros (primavera) y vaquillonas (verano) que la elipse correspondiente es muy grande en comparación con las restantes, incluyendo el centro del círculo. Este hecho estaría señalando que no existe un ritmo estadísticamente significativo, ya sea por un exceso de variabilidad en los datos o menos probable porque realmente no exista ritmo.



En cuanto a la representación de los datos cronobiológicos de amplitud y acrofase para la hemoglobina, en Figura 7, se observa un comportamiento similar en las cuatro estaciones y en las tres categorías no presentando diferencias estadísticas entre ellas, exceptuando las diferencias entre el grupo de vaquillonas y toros en primavera y otoño donde las diferencias resultaron significativas. Además se aprecia que las elipses de los grupos vacas y vaquillonas en verano y vacas en otoño incluyen el centro, por lo que no se puede afirmar la existencia de ritmo.

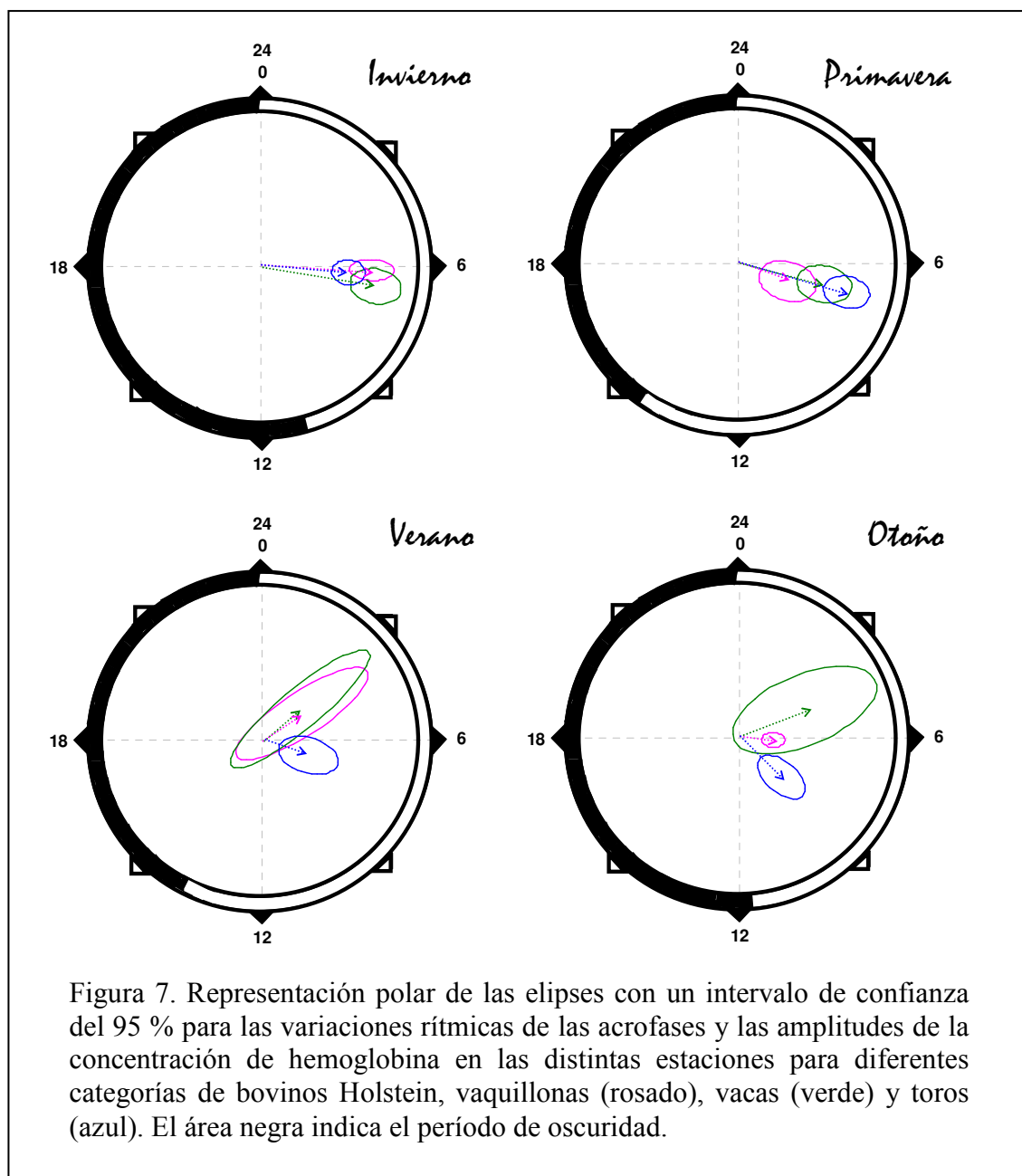


Figura 7. Representación polar de las elipses con un intervalo de confianza del 95 % para las variaciones rítmicas de las acrofases y las amplitudes de la concentración de hemoglobina en las distintas estaciones para diferentes categorías de bovinos Holstein, vaquillonas (rosado), vacas (verde) y toros (azul). El área negra indica el período de oscuridad.

En la Figura 8 se aprecia la representación polar de la expresión de la acrofase y la amplitud para el hematocrito, indicando similitud de expresión en los tres grupos en las estaciones de invierno y primavera. En verano presentaron diferencias estadísticas entre toros y vacas mientras que en vaquillonas, la elipse incluyó el centro del círculo. En otoño se apreciaron diferencias significativas en la expresión de la acrofase y la amplitud a través de la elipse entre el grupo toros y las hembras.

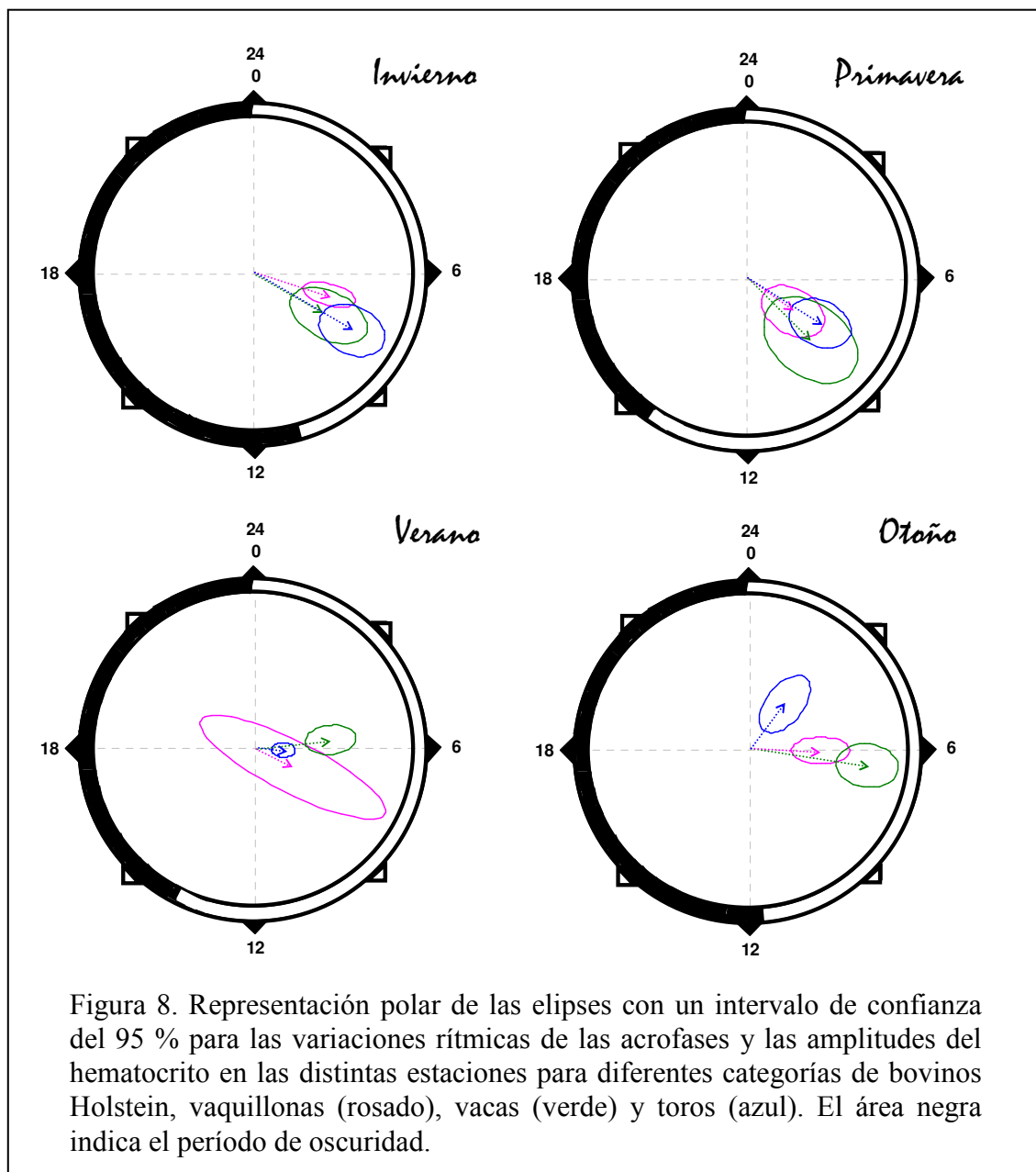


Figura 8. Representación polar de las elipses con un intervalo de confianza del 95 % para las variaciones rítmicas de las acrofases y las amplitudes del hematocrito en las distintas estaciones para diferentes categorías de bovinos Holstein, vaquillonas (rosado), vacas (verde) y toros (azul). El área negra indica el período de oscuridad.

Si bien se hallaron variaciones diarias significativas solamente para las tres variables antes descritas, el hecho de no encontrar efecto HALO significativo en los restantes componentes sanguíneo, no revela ausencia de ritmos biológicos. La falta de evidencia de estas diferencias podrían deberse a un efecto enmascarador por la alta presión de producción ejercida por el hombre en el bovino lechero ó a la gran variabilidad individual.

El reconocimiento de una estructura temporal en los elementos corpusculares circulantes en sangre periférica y en órganos hematopoyéticos, resulta valioso para la investigación y la exploración clínica de variables hematológicas. Las variaciones con altas amplitudes de algunos parámetros, por ejemplo en el número de neutrófilos y linfocitos circulantes, pueden tener implicaciones diagnósticas en medicina clínica. Los rangos de referencia estimados temporalmente son de importancia en las funciones con un ritmo de amplitud alta.

IV.2. ELECTROLITOS SÉRICOS

La Tabla 16 resume los descriptores estadísticos “F” y “p” obtenidos mediante la aplicación del análisis de la varianza con mediciones repetidas a las concentraciones séricas de los principales macrominerales de bovinos Holstein.

Tabla 16. Resultados del ANOVA que expresan los efectos de la categoría de bovinos, estación y HALO sobre concentraciones de iones en suero

Electrolito	Efectos					
	Categoría		Estación		HALO	
	Valor “F”	Valor “p”	Valor “F”	Valor “p”	Valor “F”	Valor “p”
Calcio (mmol/l)	1,18	0,3093	3,66	0,0124	28,12	0,0001
Fósforo (mmol/l)	12,21	0,0001	2,27	0,0425	1,08	0,3716
Magnesio (mmol/l)	3,87	0,0215	57,42	0,0001	28,66	0,0001
Sodio (mmol/l)	0,58	0,5607	13,26	0,0001	4,52	0,0340
Potasio (mmol/l)	1,73	0,1774	0,55	0,6497	23,01	0,0001

En dicha Tabla se puede observar que la categoría afectó en forma significativa ($p < 0,05$) solamente a los niveles de los iones fósforo y magnesio; mientras que la estación del año mostró un efecto significativo sobre las concentraciones de calcio, fósforo, magnesio y sodio. Con respecto al factor HALO, se debe destacar que resultó significativo ($p < 0,05$) para la mayoría de los iones, a excepción del fósforo.

En Tabla 17 se exponen los principales parámetros estadísticos determinados para las diferentes concentraciones iónicas en bovinos Holstein, clasificados según las categorías y estaciones del año.

Con respecto al ion calcio, los valores hallados en este trabajo, resultan similares a los rangos 1,92 - 2,39 mmol/l (Althaus y col., 1991); 2.10 – 2.33 mmol/l (Coppo, 2001) medidos en suero de bovinos en Argentina y 1,98 – 2,02 mmol/l (Meyer y Harvey, 2000) en Estados Unidos. Según la Tabla 17, los niveles en invierno y verano

resultaron inferiores a las observadas en las estaciones de primavera y otoño, para las tres categorías.

Tabla 17. Principales parámetros estadísticos de las concentraciones de iones en suero para diferentes categorías de bovinos y estaciones del año

Variable electrolítica	Estación	Vaquillonas		Vacas		Toros	
		X	DS	DS	X	DS	
Calcio (mmol/l)	Invierno	2,15 _a	0,71	2,10 _a	0,80	2,28	0,98
	Primavera	2,30 _{ab}	0,57	2,25 _{ab}	0,71	2,42	0,65
	Verano	2,22 _{ab}	0,64	2,17 _{ab}	0,71	2,25	0,52
	Otoño	2,40 _b	0,53	2,42 _b	0,58	2,40	0,50
Fósforo (mmol/l)	Invierno	1,74 _a	0,21	1,78 ^{ab} _a	0,14	1,83 ^b _a	0,15
	Primavera	1,94 _b	0,19	1,82 ^b _{ab}	0,26	1,80 ^b _a	0,22
	Verano	1,84 _c	0,24	1,86 ^a _{ab}	0,25	1,65 ^b _b	0,30
	Otoño	1,90 ^a _{bc}	0,16	1,88 ^a _b	0,20	1,69 ^b _b	0,35
Magnesio (mmol/l)	Invierno	0,98 _a	0,21	0,92 _a	0,25	0,89 _{ab}	0,22
	Primavera	0,99 _a	0,18	0,95 _a	0,24	0,96 _a	0,19
	Verano	0,96 _a	0,15	0,88 ^b _a	0,18	0,85 ^b _{bc}	0,17
	Otoño	0,70 ^a _b	0,09	0,72 ^a _b	0,11	0,78 ^b _c	0,05
Sodio (mmol/l)	Invierno	141,53	3,14	140,90 _a	4,14	140,94 _a	5,27
	Primavera	141,57 ^a	4,40	138,62 ^b _b	5,14	137,40 ^b _b	3,80
	Verano	142,90	4,670	142,24 _a	5,45	141,67 _a	5,82
	Otoño	142,04	19,06	145,78 _c	3,27	145,12 _c	3,93
Potasio (mmol/l)	Invierno	4,46 ^a	0,32	4,48 ^a	0,35	4,63 ^b	0,33
	Primavera	4,56	0,52	4,38	0,57	4,43	1,09
	Verano	4,46	0,35	4,40	0,31	4,53	0,36
	Otoño	4,60 ^a	0,41	4,47 ^{ab}	0,35	4,40 ^b	0,50

^{a, b, c}: Diferentes superíndices para valores medios de una misma fila indican diferencias significativas a un nivel de $p < 0,05$

^{a, b, c, d}: Diferentes subíndices para valores medios de una misma columna indican diferencias significativas a un nivel de $p < 0,05$ para cada variable iónica.

Por el contrario, las concentraciones de fósforo séricas (1,65 – 1,94 mmol/l) fueron más elevadas que aquellas consideradas como referencia por otros autores tales como Althaus y col. (1991); Coppo (2001) en Argentina, mientras que Meyer y Harvey (2000) informa un rango más amplio (1,50 - 2,90 mmol/l) para este ión.

En vacas y vaquillonas durante el invierno se observó una disminución del fósforo sérico, que podría deberse a la gestación avanzada. Esta disminución en la

concentración de fósforo al final de la preñez en vacas también fue informada por Kozłowska y col. (1981).

Según el Consejo Nacional de Investigaciones de EE.UU, la relación Ca^{+2}/Pi , debe estar comprendida en el rango 1,2 a 2,0 mmol Ca^{2+} /mmol Pi (Stogdale y Gundin 1983). Se debe destacar que las relaciones calculadas a partir de los datos de la Tabla 17 se encuentran dentro de estos límites.

Para ión magnesio se observa una similitud en sus niveles con respecto a los señalados por Meyer y Harvey (2000) y Coppo (2001), quienes reportan rangos de 0,7 – 1,1 mmol/l y 0,8 – 1,1 mmol/l, respectivamente. Los niveles más bajos de magnesio se presentaron en otoño para las tres categorías. Un efecto estacional similar fue señalado por Wilhelm (1985), quién informa una disminución en la concentración de magnesio durante el invierno.

Los promedios de los iones sodio y potasio obtenidos en el presente trabajo (Tabla 17) resultaron próximos a los reportados por Meyer y Harvey (2000) y Coppo (2001). Con respecto al ión sodio, tanto para las vacas como para los toros, los niveles más bajos se presentaron en primavera. La diferencia observada entre vaquillonas (primera lactancia) y vacas (tercera lactancia) podría atribuirse al aumento de la demanda de este ion debido a una mayor producción por parte del segundo grupo.

El ion potasio, presentó diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las diferentes categorías durante el invierno y el verano.

Debido a que la concentración de calcio sérico presentó variaciones cronobiológicas significativas para el efecto HALO y estación del año ($p < 0.05$), no mostrando efecto significativo entre grupos; el ajuste cosenoidal se aplicó a los datos correspondientes a los 18 animales en cada una de las cuatro estaciones para caracterizar el ritmo diario

En la Tabla 18 se indican los parámetros rítmicos determinados mediante un ajuste no lineal de una función coseno a los datos de la concentración sérica de calcio, clasificados según las estaciones.

Tabla 18. Parámetros estadísticos que expresan los modelos rítmicos diarios de los niveles de calcio sérico de bovinos Holstein

Estación	Calcio = A₀ + A₁ * Cos (w * t + Φ)								
	A ₀		A ₁		W		Φ		R
	X	ES	X	ES	X	ES	X	ES	
Invierno	2,367	0,425	0,956	0,354	0,034	0,012	04:04	04:83	0,92
Primavera	2,320	0,080	0,686	0,062	0,042	0,004	23:46	01:26	0,98
Verano	2,221	0,056	0,572	0,084	0,045	0,003	07:28	00:89	0,92
Otoño	2,393	0,078	0,587	0,112	0,044	0,004	05:32	01:39	0,88

A₀; A₁=mmol/l; w=1/h; t=h; Φ=h

X: Media muestral, ES: Error Standard, R: coeficiente de correlación del modelo.

A partir de dichos parámetros se construyó la Figura 9 donde se visualizan las medias de los niveles séricos de calcio determinados en función de HALO, así como también las curvas ajustadas mediante el modelo cosenoidal, para las cuatro estaciones. Los elevados valores de los coeficientes de correlación (R, Tabla 18) ponen de manifiesto el adecuado ajuste alcanzado mediante el modelo de regresión no lineal, al resultar en todos los casos superior a 0,88.

Los valores de los períodos (T) se calcularon teniendo en cuenta las frecuencias de la Tabla 18. Se puede considerar que las variaciones en la concentración de calcio sérico se ajustan a un ritmo diario, con períodos de 29:07 h (invierno); 23:53 h (primavera); 22:07 h (verano) y 22:35 h (otoño), comprendidos en el rango 16:00 – 32:00 h.

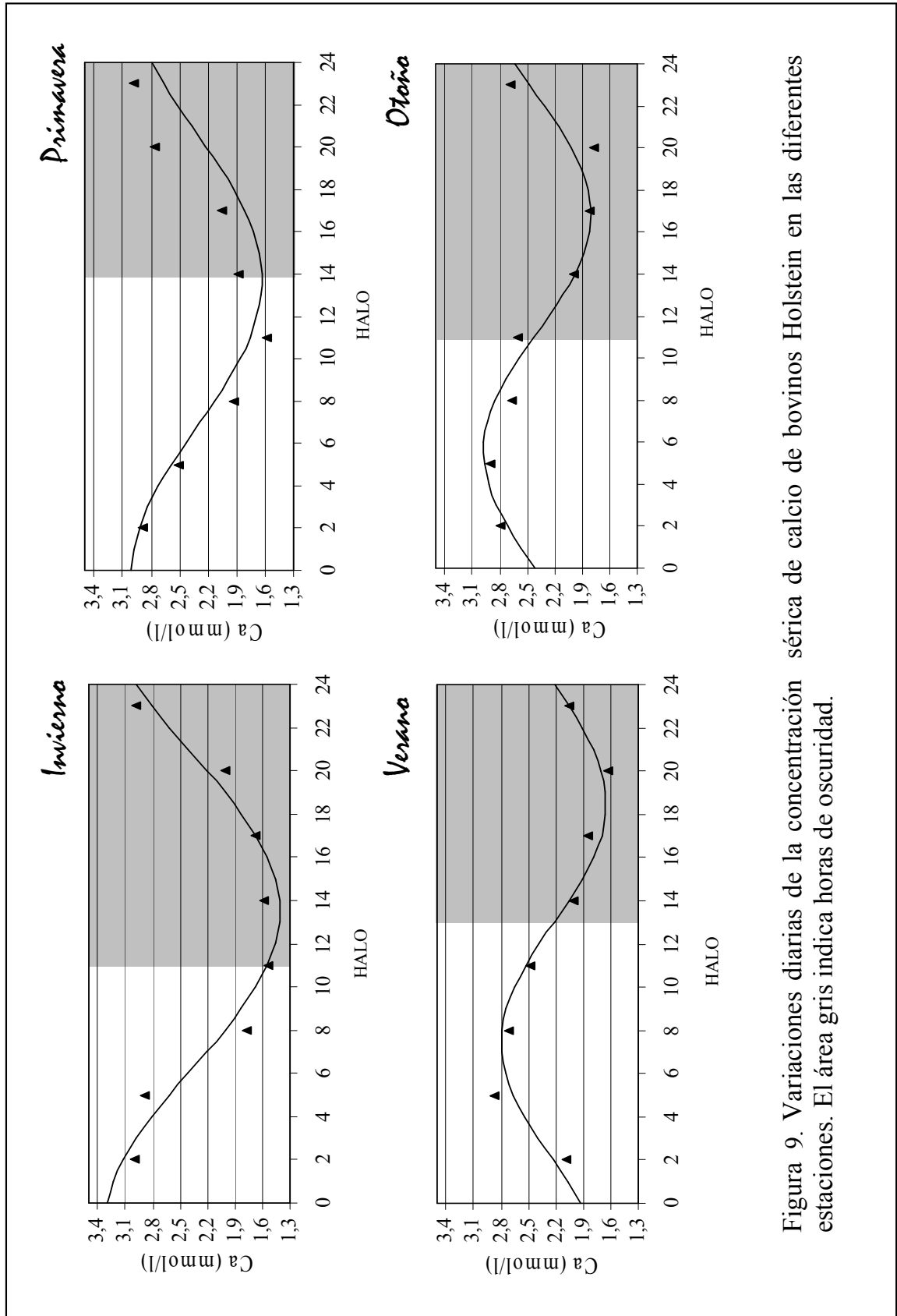


Figura 9. Variaciones diarias de la concentración sérica de calcio de bovinos Holstein en las diferentes estaciones. El área gris indica horas de oscuridad.

Del análisis de Tabla 18 y Figura 9 se pone en evidencia que los valores del mesor y amplitud fueron menores en verano que en el resto de las estaciones. Las acrofases correspondientes se observaron en invierno 04:04 HALO (10:06 h), verano 07:28 HALO (13:16 h) y otoño 05:32 HALO (13:30 h) durante las horas de luz, mientras en primavera se presentó prácticamente al salir el sol 23:46 HALO (04:62 h). Las diferencias en las acrofases podrían deberse a los cambios estacionales por acción del fotoperíodo.

La interpretación de las muestras de calcio obtenidas al azar debe realizarse teniendo en cuenta la hora del día en que fueron extraídas, edad, raza, sexo y dieta de los animales. La significancia fisiológica de la ritmicidad del calcio y fósforo y su influencia en otros procesos metabólicos no está aún comprendida; no obstante, el conocimiento de la ritmicidad de estos minerales es útil desde el punto de vista clínico.

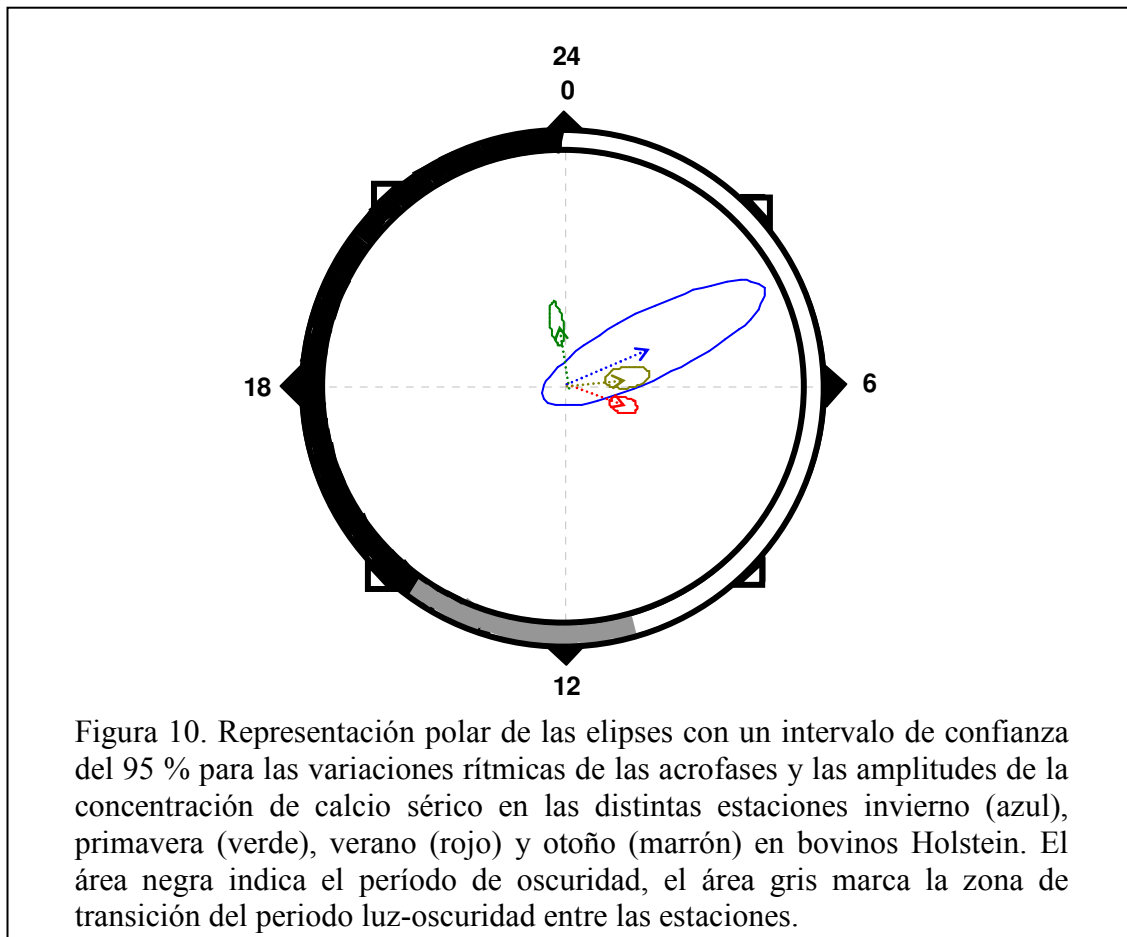
Hiperparatiroidismo, falla renal, hipercalcemia e hipocalcemia, hiperfosfatemia e hipofosfatemia, tetania puerperal, hipercalcitonina e hipocalcitonina, osteomalacia y osteoporosis están, relacionadas con los niveles de calcio y fósforo (Ettinger y Feldman, 2000; Capen y Rosol, 1989). En el diagnóstico de desbalances minerales es necesario tener en cuenta la forma rítmica de los electrolitos estudiados y la terapia específica debe ser realizada en el momento del día donde la ritmicidad circadiana garantice la mejor utilización de sustancias o drogas. Se debería realizar un estudio preliminar sobre la aplicación de una metodología cronopatológica y cronoterapéutica en bovinos.

Con el propósito de representar las amplitudes y acrofases para cada estación, se construyó la gráfica polar (Figura 10), donde se aprecia que la elipse correspondiente a los datos de invierno es muy grande en comparación con las restantes, incluyendo el centro del círculo. Este hecho no permite afirmar con una seguridad del 95 %, la existencia de un ritmo diario, pudiendo atribuirse, entre otros factores, a una gran variabilidad por parte de las muestras.

Al respecto se puede mencionar el estudio realizado por Bajksy y col. (1999) con el propósito de evaluar las variaciones circadianas en las concentraciones

sanguíneas de Ca ionizado en 14 vacas lecheras en lactancia tardía. Dichos autores observaron que 6 animales presentaron acrofase entre las 14 h y las 16 h, mientras que los 8 animales restantes lo mostraron entre la medianoche y las 8 h, no hallando justificación alguna a estas variaciones individuales en los niveles de calcio.

También se observa que existen diferencias estadísticamente significativas (95 %) para la acrofase y amplitud entre primavera, verano y otoño debido a que las elipses de estas estaciones no se tocan o interceptan, a pesar de ello las acrofases se presentaron en general en la fase fótica.



Estos resultados coinciden con los hábitos diurnos de los bovinos, que aumentan su actividad durante el ciclo luminoso, presentando de esta manera, un mayor

metabolismo y un aumento en la movilización de Ca^{+2} y Pi hacia el torrente sanguíneo (Smith, 1996). Coincide así mismo con el aumento en la actividad del sistema endócrino, incluyendo la paratohormona, responsable de la regulación de los niveles de ambos minerales (Haus y col., 1988; Smith, 1996).

También, en el hemisferio sur (Argentina), un estudio realizado en terneros Holando Argentino durante el verano por Valtorta y col. (2000) pone de manifiesto que las variaciones séricas de Ca^{+2} y Pi parecen ajustarse a un ritmo diario con acrofase a las 15:28 h para ambos minerales, similar a los resultados hallados para el ión calcio en este trabajo.

Para otras especies, Piccione y col. (2004) observaron ritmos diarios en los niveles de calcio en perros de diferentes edades y sexo, con la presencia de acrofases diurnas en un período comprendido entre 9:16 y 12:00 h.

La acrofase para Ca^{+2} y Pi también se observa durante las horas de luz en humanos, que poseen hábitos diurnos. Si bien los resultados presentaron variaciones según los diferentes autores (Sheving y col., 1977; Reinberg, 1979b; Haus y col., 1988), estas variaciones se encuentran influenciadas por las diferencias entre los grupos muestreados, en lo que respecta a su ubicación geográfica, dado que factores tales como temperatura, horas de luz y hábitos sociales, todos ellos importantes sincronizadores en seres humanos, varían de un estudio a otro (Mayerbach, 1976; Steimbach y col., 1976).

Los niveles hemáticos de Ca^{+2} y Pi están relacionados con diversos procesos, tales como los ritmos hormonales, rutas metabólicas, actividad enzimática, pH sanguíneo, pH de orina y actividad de los pre-estómagos. Dichos procesos presentan ritmos propios siendo, por lo tanto, difícil determinar hasta que punto cada uno de ellos es responsable del resultado final. A pesar de estas consideraciones, los hallazgos aquí presentados parecen mostrar que los niveles plasmáticos de Ca^{+2} responden al tiempo de un reloj biológico en los bovinos (Valtorta y col., 2000).

El análisis de varianza no detectó diferencias diarias (efecto HALO) para la concentración sérica de fósforo, por tal motivo, los datos correspondientes no se sometieron a un ajuste mediante una función coseno. Como se señaló anteriormente, diversos autores informaron variaciones diarias en los niveles séricos de calcio y fósforo, no coincidiendo con lo observado para el fósforo en este estudio.

En los bovinos, se han detectado variaciones diarias en las concentraciones de diferentes minerales de la sangre, según el momento en que se efectuó la determinación. Tal es el caso de los iones calcio, fósforo, sodio y potasio (Bajksy y col., 1999 y Valtorta y col., 2000). Sin embargo, en la bibliografía disponible no se han encontrado estudios referentes al ión magnesio.

En lo que respecta a este ión (magnesio), debido a que existieron cambios significativos ($p < 0,05$) en los tres efectos (categoría, estación y HALO), el análisis por series temporales se aplicó a los animales de cada categoría ($n = 6$) en las cuatro estaciones del año. Los componentes rítmicos calculados mediante un ajuste no lineal de una función coseno para las variaciones diarias de la concentración del ión magnesio, se resumen en Tabla 19.

Con el fin de visualizar mejor los parámetros que caracterizan el ritmo diario de la concentración sérica de magnesio, se ha elaborado la Figura 11, donde se visualiza los valores medios calculados para cada HALO en las diferentes categorías de animales y estaciones del año, así como las curvas construidas mediante la aplicación del modelo de ajuste cosenoidal a la variable en estudio obtenida a partir de los datos de Tabla 19.

Los elevados valores de los coeficientes de concordancia (R), que se encuentran comprendidos entre 0,83 y 0,96, indican el adecuado ajuste logrado mediante la aplicación de este modelo no lineal para el ión magnesio.

Tabla 19. Modelos rítmicos diarios determinados mediante un ajuste no lineal de una función coseno que representan las variaciones temporales de los niveles de magnesio sérico de bovinos Holstein

		Magnesio = A₀ + A₁ * Cos (w * t + Φ)									
Estación	Categoría	A ₀		A ₁		W		Φ		R	
		X	ES	X	ES	X	ES	X	ES		
Invierno	Vaquillona	1,003	0,034	0,259	0,045	0,047	0,004	09:40	01:17	0,83	
	Vaca	0,940	0,059	0,276	0,085	0,049	0,006	09:04	01:81	0,87	
	Toro	0,911	0,048	0,223	0,070	0,049	0,006	08:90	01:79	0,86	
Primavera	Vaquillona	0,977	0,019	0,154	0,027	0,054	0,003	06:42	00:88	0,92	
	Vaca	0,945	0,017	0,160	0,026	0,050	0,003	07:26	00:83	0,91	
	Toro	0,962	0,022	0,147	0,033	0,044	0,004	07:17	01:44	0,84	
Verano	Vaquillona	0,967	0,025	0,125	0,025	0,043	0,007	10:38	02:03	0,87	
	Vaca	0,876	0,023	0,156	0,031	0,042	0,005	08:18	01:42	0,89	
	Toro	0,854	0,027	0,150	0,038	0,043	0,006	08:02	01:70	0,87	
Otoño	Vaquillona	0,701	0,023	0,062	0,024	0,038	0,013	08:44	03:71	0,96	
	Vaca	0,738	0,018	0,085	0,025	0,062	0,007	14:11	01:37	0,97	
	Toro	0,793	0,013	0,045	0,012	0,047	0,013	12:56	03:53	0,95	

A₀; A₁=mmol/l; w=1/h; t=h; Φ=h

X: Media muestral, ES: Error Standard, R: coeficiente de correlación del modelo.

Los valores medios de los períodos (T) de los ritmos de magnesio (Tabla 20) en vaquillonas, vacas y toros se dedujeron a partir de los valores de frecuencia (W) indicados en Tabla 19. Se pone de manifiesto que el ion magnesio presenta ritmicidad diaria, con un período de alrededor de 24 h (Tabla 20).

Tabla 20. Valores medios de los períodos de los ritmos de magnesio sérico de bovinos Holstein

Categoría	Invierno	Primavera	Verano	Otoño
Vaquillona	21:04	18:22	23:10	26:37
Vaca	20:28	19:49	23:31	16:01
Toro	20:19	22:40	23:10	21:13

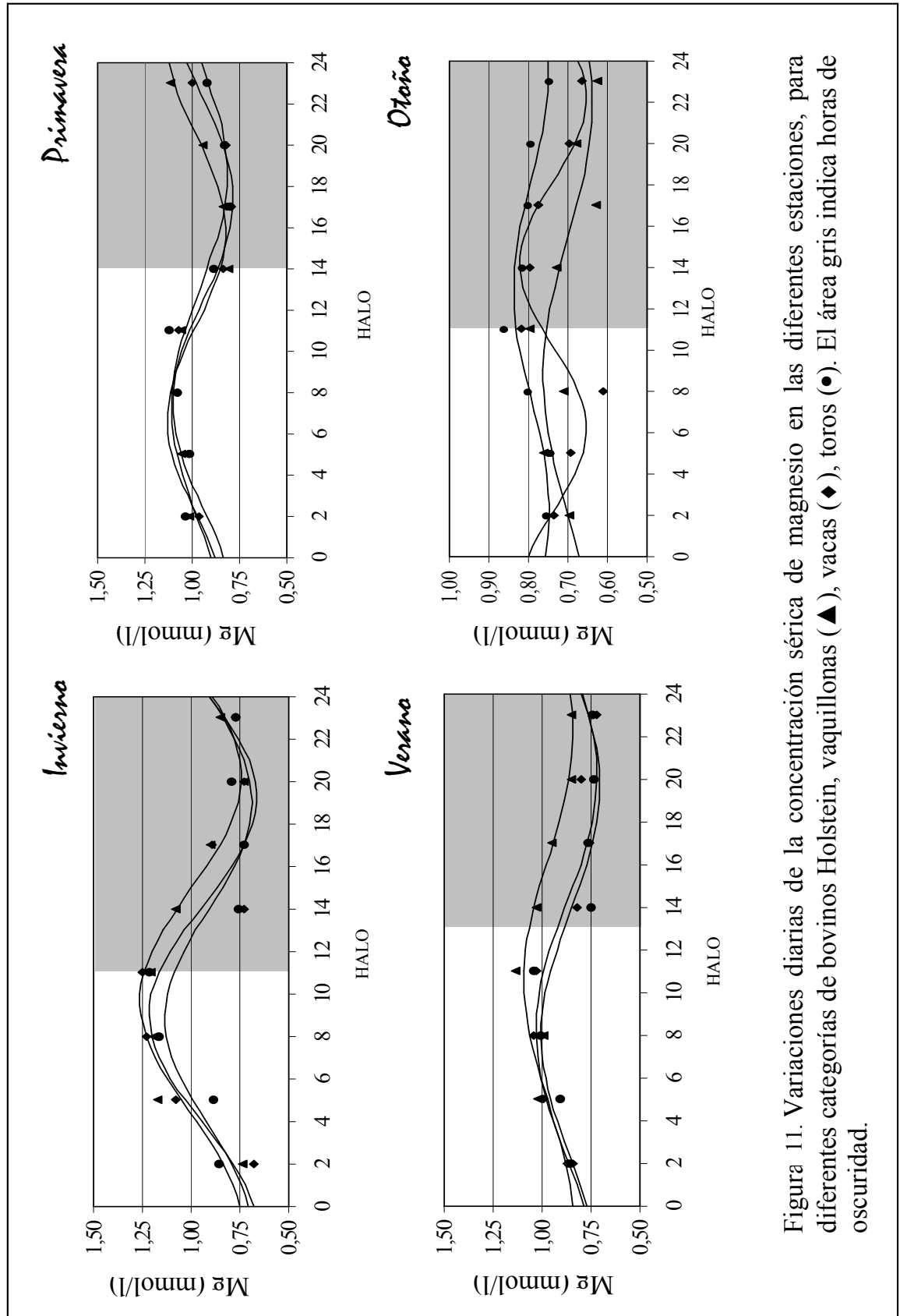


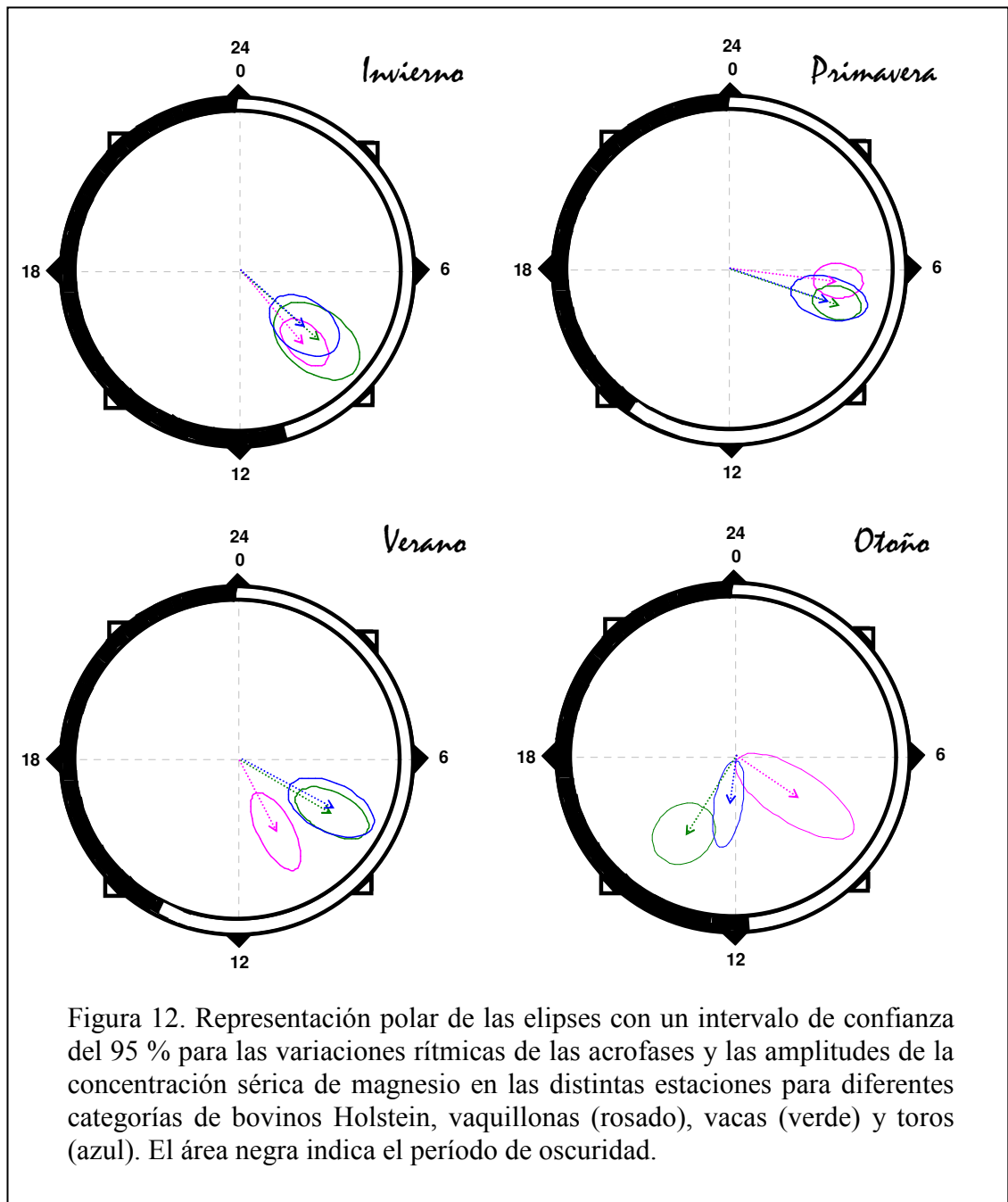
Figura 11. Variaciones diarias de la concentración sérica de magnesio en las diferentes estaciones, para diferentes categorías de bovinos Holstein, vaquillonas (▲), vacas (◆), toros (●). El área gris indica horas de oscuridad.

En Tabla 19 y en las gráficas que constituyen la Figura 11 se puede apreciar que los valores del mesor y amplitud fueron menores en otoño para todas las categorías. Se observa además la gran similitud que existe entre las curvas rítmicas obtenidas en invierno, primavera y verano, donde se evidencia que las acrofases se expresan durante las horas de luz.

A pesar que el ion magnesio presenta variaciones temporales durante el día, debida a la pequeña amplitud observada, los valores máximos (acrofase) y mínimos (batifase) no se alejan de los valores de referencia, por lo que la hora del día en que se realicen las determinaciones no afecta los criterios diagnósticos y de análisis clínico.

La gráfica polar (Figura 12) se construyó a fin de lograr una mejor visualización de las acrofase y la amplitud estimadas mediante un ajuste no lineal de la función coseno junto con la elipse de confianza para un 95 %. En dicha gráfica se aprecia que entre las acrofases y amplitudes expresadas en las diferentes categorías en invierno y primavera, no existen diferencias estadísticamente significativas debido a que las elipses no se tocan ni interceptan. En verano las vaquillonas mostraron diferente comportamiento que las vacas y los toros. En otoño existen diferencias significativas entre vacas y vaquillonas.

Las variaciones del ion magnesio observadas a lo largo del día y en las diferentes estaciones del año, podrían estar afectada por procesos que determinan los ritmos en otros componentes y variables sanguíneas, tales como el pH, actividad de los preestómagos, ritmos hormonales y otros minerales como por ejemplo el calcio.



Con respecto al ion sodio, debido a que existieron cambios cronobiológicos (efecto HALO) significativos ($p < 0,05$) y no hubo diferencias significativas entre grupos, se unieron las tres categorías para caracterizar y cuantificar el ritmo diario de este electrolito en cada una de las estaciones del año por medio del análisis de series

temporales. En Tabla 21 se exponen los parámetros rítmicos correspondientes a los niveles de sodio séricos clasificados según las estaciones.

Tabla 21. Modelo rítmico diario determinado mediante un ajuste no lineal de una función coseno que representa la variación temporal de los niveles de sodio sérico de bovinos Holstein

Estación	Sodio = A₀ + A₁ * Cos (w * t + Φ)								
	A ₀		A ₁		W		Φ		R
	X	ES	X	ES	X	ES	X	ES	
Invierno	141,485	0,472	3,382	0,438	0,036	0,005	2,190	2,114	0,94
Primavera	139,404	0,306	2,251	0,453	0,038	0,000	0,470	0,761	0,83
Verano	141,599	0,950	4,881	0,916	0,048	0,008	2,300	2,306	0,88
Otoño	143,826	0,556	3,808	0,758	0,052	0,005	5,370	1,226	0,87

A₀; A₁=mmol/l; w=1/h; t=h; Φ=h

X: Media muestral, ES: Error Standard, R: coeficiente de correlación del modelo.

A partir de estos parámetros se construyó la Figura 13 donde se representan, tanto los puntos experimentales obtenidos en las diferentes estaciones del año, como las curvas construidas mediante la aplicación del modelo de ajuste cosenoidal a la variable en estudio.

En lo que respecta a los coeficientes de concordancia, se han obtenido valores elevados, al hallarse comprendidos entre 0,83 y 0,94. Este hecho revela un adecuado ajuste alcanzado mediante la aplicación del modelo no lineal.

A fin de determinar si los ritmos biológicos de la concentración de sodio registrada en las diferentes estaciones se ajustan a un ritmo diario se procedió a calcular los valores de períodos (T) a partir de las frecuencias de la Tabla 21. Se aprecia que el ion sodio presenta períodos de 28:02 HALO en invierno, 26:10 HALO en primavera, 20:40 HALO en verano y 19:16 HALO en otoño, poniendo de manifiesto que las variaciones de su concentración son diarias. Este hecho se puede visualizar además en las gráficas de la Figura 13.

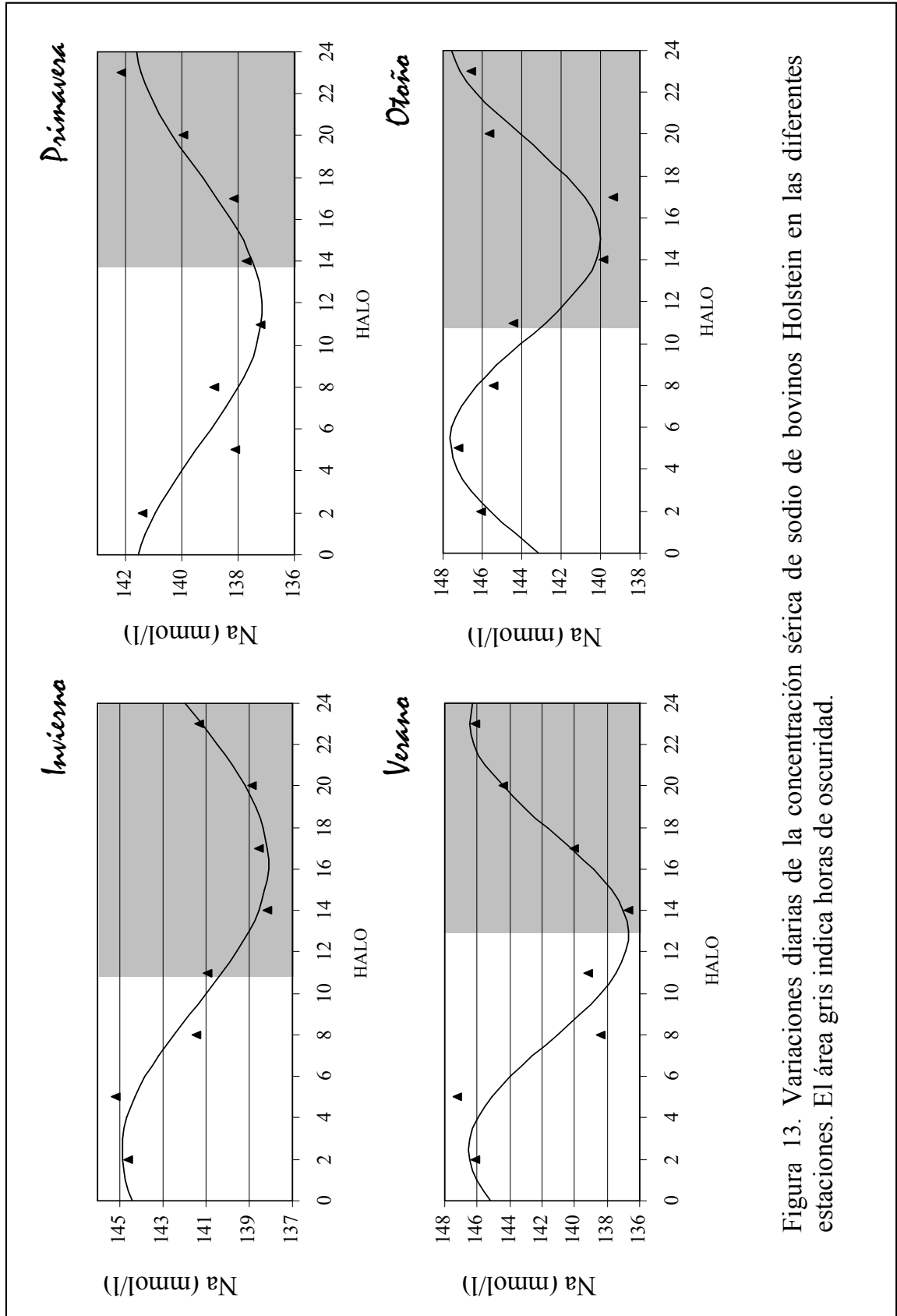


Figura 13. Variaciones diarias de la concentración sérica de sodio de bovinos Holstein en las diferentes estaciones. El área gris indica horas de oscuridad.

En Tabla 21 y Figura 13 se advierte que los valores del mesor y amplitud fueron menores en la primavera. Por otra parte, en todas las estaciones, los niveles séricos de sodio presentaron una fluctuación durante el período de 24 h caracterizada por la existencia de la acrofase en las horas de la mañana. Este hecho estaría indicando una intervención de mecanismos endógenos de medición del tiempo en la regulación de la concentración plasmática de sodio, teniendo en cuenta la similitud y el paralelismo de dichas oscilaciones.

Resultados similares observan Bajksy y col. (1999) en un estudio realizado con vacas lecheras que se hallan en la lactancia tardía durante la primavera. Dichos autores determinan que los valores máximos para las concentraciones de sodio plasmático se presentaban a las 14 h.

Debido a que el ión sodio se mantiene en un rango de estrecha variación, las diferencias rítmicas son clínicamente irrelevantes desde el punto de vista del análisis clínico, pero las variaciones en las concentraciones de Na^+ resultan interesantes desde el punto de vista fisiológico, ya que presentan un ritmo muy similar en las diferentes estaciones.

Todos los componentes del eje renina-angiotensina-aldosterona presentan una variación de sus concentraciones plasmáticas a lo largo del día. El ritmo de estas hormonas parece estar ligado fundamentalmente a un ciclo de actividad reposo y no a un ritmo luz oscuridad (Breur y col, 1974).

Se debe considerar que, si bien los rumiantes son animales de hábitos diurnos, durante el verano disminuyen su actividad especialmente en los períodos del día que presentan una mayor carga calórica. En un trabajo llevado a cabo en la cuenca central santafesina, se encontró que la actividad en pastoreo durante el verano es prácticamente nula entre las 10 y las 15 h (Valtorta y col., 1996, 1997).

Teniendo en cuenta el comportamiento y costumbre de los bovinos es posible que la actividad motora realizada en las primeras horas del día sea capaz de determinar

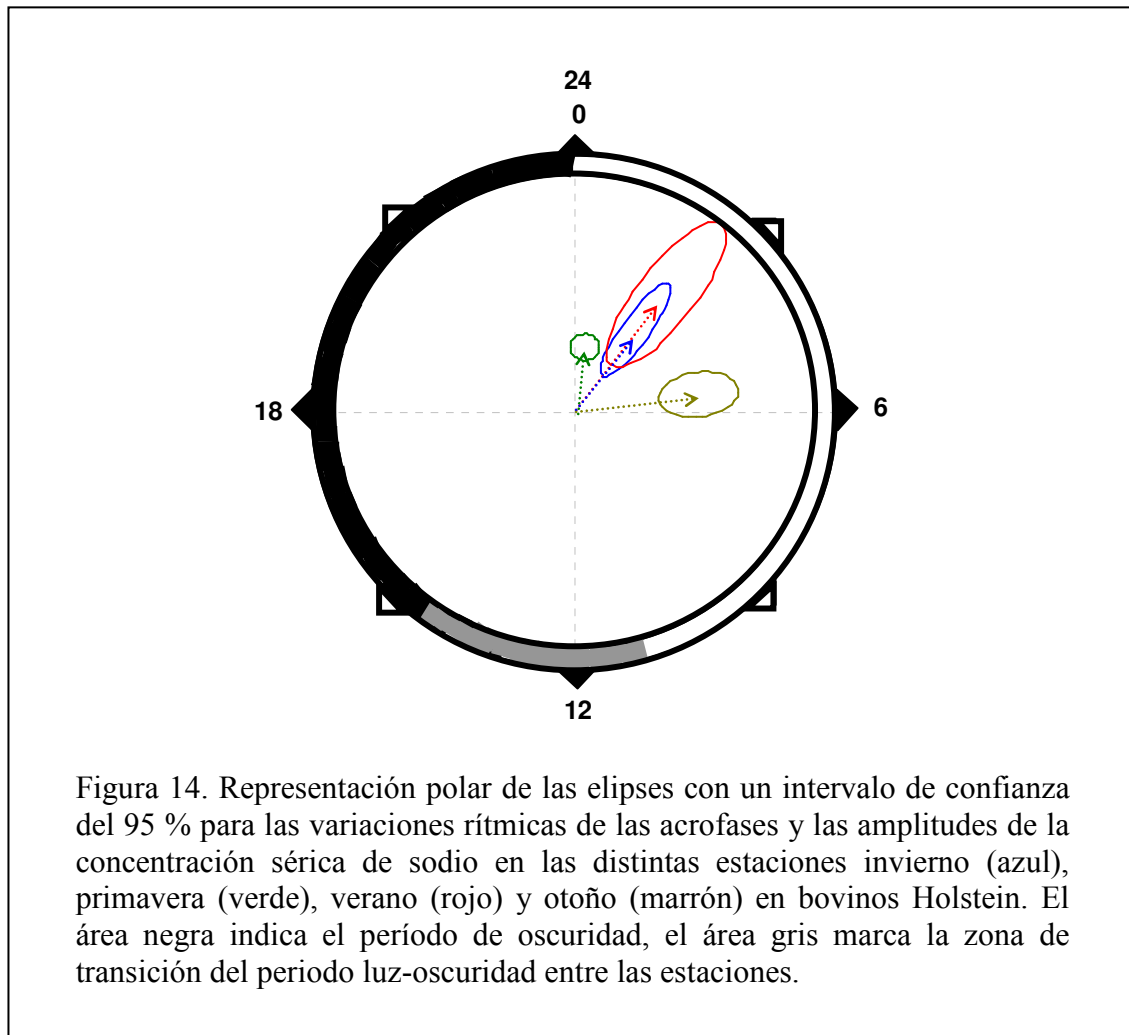
el ritmo de la aldosterona y en consecuencia los ritmos de las concentraciones de sodio y potasio. En los rumiantes, la aldosterona es el principal y más potente mineralcorticoide regulador de la homeostasia de sodio y potasio. La producción normal de aldosterona muestra una tendencia a ritmos circadianos. El período de descanso sostenido durante sueño precede a los más altos niveles de aldosterona, con una concentración máxima a las 06:00 h, mientras que los niveles mas bajos se observan después de la actividad diurna, alcanzando la concentración mínima a las 20:00 h (Ruckebusch y col., 1994).

Una de las funciones más importantes de la aldosterona es aumentar la reabsorción de sodio por los túbulos renales, el intercambio con los iones H^+ y K^+ , con lo que se eleva la concentración de sodio en el líquido extracelular (Ruckebusch y col., 1994).

Teniendo en cuenta que la fluctuación de la aldosterona descrita en la literatura coincide con las oscilaciones encontradas en este trabajo para el ion sodio, esta hormona, al experimentar diferentes variaciones diarias, puede estar ejerciendo un importante rol como sincronizadora de la variación diaria de los iones sodio y potasio.

Al igual que en los casos anteriores, con el propósito de sintetizar en forma simple la distribución de las amplitudes y acrofases para cada estación del año, se ha construido la Figura 14 en coordenadas polares. En dicha figura se puede apreciar que no existen diferencias significativas (intervalo de confianza 95%) en la expresión de la acrofase y amplitud entre invierno y verano, debido a que las elipses se superponen, a diferencia de otoño y primavera donde existen diferencias significativas.

Además se evidencia en todas las estaciones que ninguna elipse incluye el centro del círculo. Este hecho nos indicaría que existe un ritmo estadísticamente significativo, que no puede llegar a confundirse con un simple ruido.



Para caracterizar y cuantificar el ritmo diario de la concentración de potasio por medio del análisis de series temporales, debido a que se presentaron cambios cronobiológicos (efecto HALO) significativos ($p < 0.0001$) y no hubo diferencias significativas entre los grupos y las estaciones, se agruparon los datos provenientes de los 72 animales.

En Tabla 22 se presentan los componentes rítmicos correspondientes a la variación temporal de la concentración sérica de potasio en bovinos Holstein. A partir de dichos parámetros se construyó la Figura 15 donde se visualizan las variaciones rítmicas ajustadas por el modelo de regresión no lineal y los valores medios calculados para cada HALO. También se calculó el valor del período ($T = 22:26$ h) a partir de la frecuencia de la Tabla 22. Se puede observar en Figura 13 el adecuado ajuste logrado

mediante el modelo cosenoidal con un elevado valor de correlación (R= 0,88, Tabla 22). La acrofase se presentó a las 07:47 HALO, con una amplitud de 0,2 mmol/l y un mesor 4,487mmol/l.

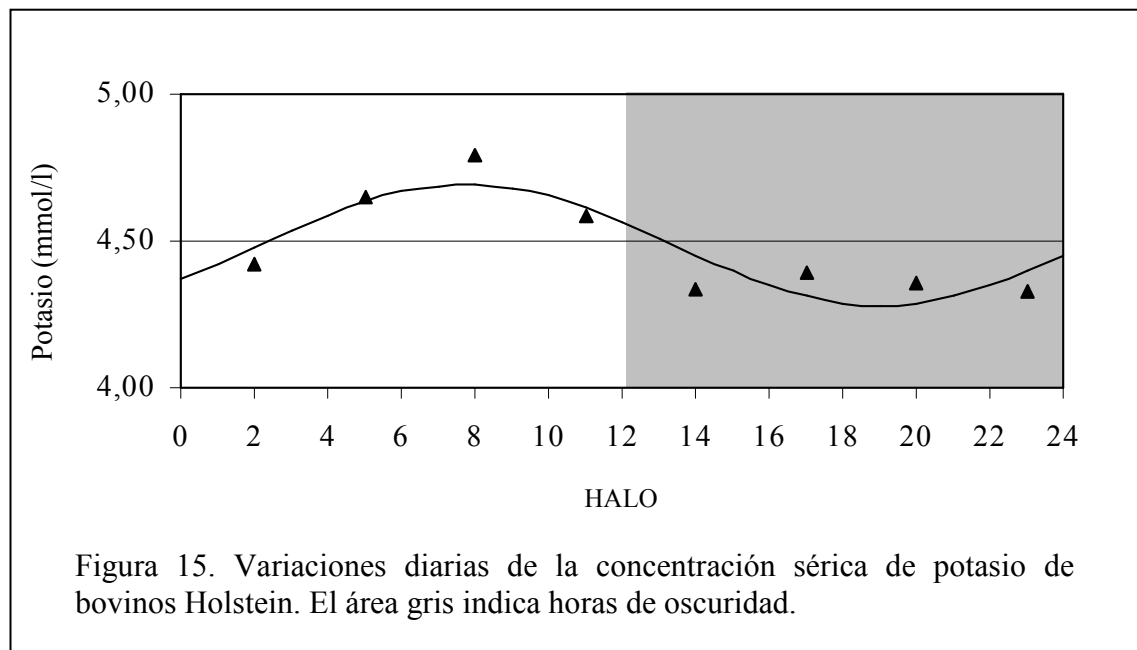
Tabla 22. Modelo rítmico diario determinado mediante un ajuste no lineal de una función coseno que representa la variación temporal de los niveles de potasio sérico de bovinos Holstein

Potasio = A₀ + A₁ * Cos (w * t + Φ)									
A₀		A₁		W		Φ		R	
X	ES	X	ES	X	ES	X	ES		
4,487	0,038	0,207	0,057	0,045	0,006	07:47	01:71	0,88	

A₀; A₁=mmol/l; w=1/h; t=h; Φ=h

X: Media muestral, ES: Error Standard, R: coeficiente de correlación del modelo.

Bajksy y col. (1999) establecieron para las concentraciones plasmáticas de sodio y potasio variaciones circadianas en vacas lecheras con picos opuestos, no coincidiendo con lo determinado en este estudio. Estas discrepancias pueden atribuirse a que las variaciones se encuentran influenciadas por las diferencias entre grupos muestreados en cuanto a su ubicación geográfica, dado que factores tales como la temperatura, horas de luz y hábitos son importantes sincronizadores que varían entre los diferentes estudios.



Debido a la pequeña variación observada en la amplitud del ritmo para el ion potasio, las diferencias rítmicas resultan clínicamente irrelevantes desde el punto de vista del análisis y el diagnóstico clínico.

En el gráfico polar (Figura 16) se muestran la distribución la elipse con un intervalo de confianza del 95 % para la amplitud y acrofase de la concentración sérica de potasio. En dicha gráfica se observa este ion presenta ritmo estadísticamente significativos ya que la elipse no incluye el cero.

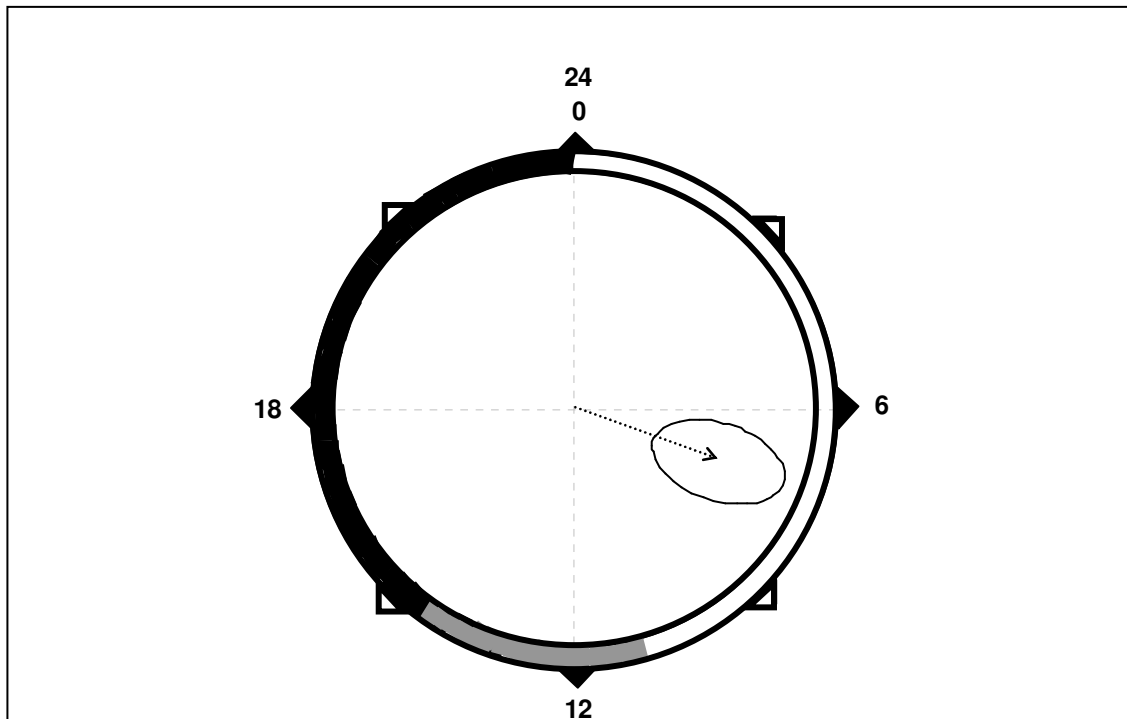


Figura 16. Representación polar de las elipses con un intervalo de confianza del 95 % para las variaciones rítmicas de las acrofases y las amplitudes de la concentración sérica de potasio en bovinos Holstein. El área negra indica el período de oscuridad, el área gris marca la zona de transición del periodo luz-oscuridad entre las estaciones.

Las variaciones diarias en las concentraciones de sodio y potasio sérico en bovinos podrían, al igual que sucede en el hombre, ser respuestas periódicas (ritmos biológicos) que permitirían al organismo predecir el momento de probable aparición de un estímulo ambiental y así iniciar de antemano la corrección adecuada (homeostasis

predictiva). Moore-Ede (1986) demostró que en el hombre existe un mecanismo de homeostasis predictiva relacionada con el descanso nocturno y la postura, al pasar de la posición de ortostatismo a la de decúbito, que nos protege de las pérdidas de minerales y fluidos ganados durante el día. Así es que un descanso matutino induce un incremento en la eliminación renal de sodio, agua y calcio, mientras que el descanso nocturno no produce estos efectos.

IV.3. METABOLITOS SÉRICOS

A fin de estudiar los factores que pueden afectar a los principales componentes bioquímicos del suero de bovinos Holstein, se efectuaron análisis de varianza con muestras repetidas (ANOVA-MR) mediante el procedimiento GLM, en el diseño del modelo estadístico se ha considerado la influencia de los factores categoría (toros, hembras 1ra lactancia y hembras 3ra lactancia), estación y HALO.

Los resultados de estos análisis referentes a sus correspondientes niveles de significación se resumen en Tabla 23. Del análisis de los resultados, se debe destacar que la estación del año afectó en forma significativa ($p < 0,05$) a los niveles de glucosa, triglicéridos, colesterol, bilirrubina total y creatinina. También la categoría mostró efecto significativo ($p < 0,05$) sobre los niveles de los metabolitos del suero estudiados excepto la glucosa. Con respecto al factor HALO, su efecto resultó significativo ($p < 0,05$) solamente para glucosa.

Tabla 23. Resultados del ANOVA que expresan los efectos de la categoría de bovinos, estación y HALO las variables bioquímicas

Metabolito	Efectos					
	Categoría		Estación		HALO	
	Valor “F”	Valor “p”	Valor “F”	Valor “p”	Valor “F”	Valor “p”
Glucosa (mmol/l)	0,85	0,4282	10,63	0,0001	15,11	0,0001
Colesterol (mmol/l)	56,64	0,0001	61,5	0,0001	1,10	0,2955
Triglicéridos ($\mu\text{mol/l}$)	10,43	0,0001	55,85	0,0001	1,12	0,2895
Bilirrubina T ($\mu\text{mol/l}$)	29,11	0,0001	65,49	0,0001	1,33	0,2491

En Tabla 24 se exponen los principales parámetros estadísticos de los metabolitos del suero de vacas lecheras Holstein, todos ellos expresados en unidades del Sistema Internacional de Medidas (Doxey, 1977).

Tabla 24. Principales parámetros estadísticos de las variables bioquímicas sanguíneas para diferentes categorías de bovinos y estaciones del año

Variable bioquímica	Estación	Vaquillonas		Vacas		Toros	
		X	DS	X	DS	X	DS
Glucosa (mmol/l)	Invierno	3,99 ^a	0,98	3,94 ^a	0,97	3,98 ^a	1,13
	Primavera	3,51 ^b	0,71	3,57 ^b	0,68	3,41 ^b	0,56
	Verano	3,69 ^{ab}	0,70	3,67 ^{ab}	0,62	3,97 ^b	0,73
	Otoño	3,45 ^b	0,91	3,72 ^{ab}	0,86	3,69 ^{ab}	0,83
Colesterol (mmol/l)	Invierno	3,63 ^{ac}	0,71	3,83 ^a	0,50	2,67 ^b	1,01
	Primavera	3,19 ^a	0,34	2,28 ^b	0,64	2,54 ^c	0,40
	Verano	3,37 ^{ab}	0,66	2,74 ^b	0,66	2,53 ^b	0,68
	Otoño	3,67 ^a	0,81	3,23 ^b	0,57	3,58 ^a	0,59
Triglicéridos (µmol/l)	Invierno	0,19 ^a	0,09	0,13 ^b	0,05	0,11 ^b	0,04
	Primavera	0,10 ^a	0,04	0,09 ^{ab}	0,04	0,08 ^b	0,03
	Verano	0,07 ^a	0,06	0,06 ^{ab}	0,05	0,04 ^b	0,02
	Otoño	0,11 ^c	0,07	0,11 ^b	0,07	0,13 ^d	0,09
BilirrubinaT (µmol/l)	Invierno	2,57 ^a	1,22	2,58 ^a	0,94	1,45 ^b	0,67
	Primavera	1,90 ^a	1,19	2,51 ^b	1,78	1,48 ^a	0,62
	Verano	3,72 ^a	1,04	3,36 ^{ab}	0,93	3,00 ^b	1,12
	Otoño	2,03 ^a	0,98	1,79 ^a	0,89	1,40 ^b	0,85

^{a, b, c}: Diferentes superíndices para valores medios de una misma fila indican diferencias significativas a un nivel de $p < 0,05$

^{a, b, c, d}: Diferentes subíndices para valores medios de una misma columna indican diferencias significativas a un nivel de $p < 0,05$ para cada variable bioquímica.

Los niveles cuantificados para glucosa plasmática (Tabla 15) están comprendidos dentro de los valores reportados por Meyer y Harvey (2000) quienes señalan un rango de 2,0-3,9 mmol/l, resultando, en alguno casos, superiores a los rangos 2,74-3,24 mmol/l (Blum y col., 1983); 2,3- 3,8 mmol/l (Corbellini, 1983); 2,7-3,4 mmol/l (Coppo, 2001) e inferiores a los informados por 3,9-4,9 mmol/l (Althaus y col., 1992), todos ellos determinados en plasma de bovinos lecheros.

Los niveles de glucosa fueron significativamente ($p < 0,05$) mayores en invierno que en el resto de las estaciones, para las tres categorías. En las hembras, estos valores parecen relacionarse con los cambios normales del parto (Hart y col., 1979). La disminución de la concentración de glucosa observada durante el comienzo de la lactancia (primavera), podría deberse principalmente a la elevada captación de este

sustrato por la ubre, principalmente para la síntesis de lactosa (Bickerstaffe y col., 1974). Aproximadamente a los 120 días post parto (verano), la glicemia se incrementa para disminuir luego en el período de lactancia tardía (otoño). Un comportamiento semejante en la curva de la concentración plasmática de glucosa durante la lactación fue descrito por Blum y col. (1983).

En toros, la concentración sérica de glucosa presentó un comportamiento similar al observado en las hembras, por lo que los niveles de glucosa durante las diferentes estaciones del año podrían estar más relacionadas a cambios estacionales que a la curva de producción.

Con el propósito de describir y estimar los parámetros rítmicos que expresan la variación de la concentración de glucosa plasmática en las diferentes estaciones del año, se agruparon los valores de glucosa correspondiente a los tres grupos (n= 18 animales), debido a que se presentaron cambios cronobiológicos (efecto HALO) significativos (p < 0,05), pero no hubo diferencias significativas entre los grupos considerados en el estudio. En Tabla 25 se resumen los principales parámetros rítmicos que modelan el comportamiento de la glucosa plasmática calculados mediante la aplicación del ajuste cosenoidal.

Tabla 25. Parámetros estadísticos que expresan los modelos rítmicos diarios de los niveles de glucosa sérica de bovinos Holstein

Estación	Glucosa = A₀ + A₁ * Cos (w * t + Φ)								
	A ₀		A ₁		W		Φ		R
	X	ES	X	ES	X	ES	X	ES	
Invierno	4,026	0,115	0,919	0,131	0,034	0,005	21:18	01:88	0,96
Primavera	3,556	0,045	0,497	0,059	0,050	0,003	14:40	00:88	0,97
Verano	3,722	0,113	0,642	0,152	0,048	0,006	20:14	01:58	0,91
Otoño	3,494	0,070	0,796	0,072	0,796	0,072	02:44	01:01	0,98

A₀; A₁=mmol/l; w=1/h; t=h; Φ=h

X: Media muestral, ES: Error Standard, R: coeficiente de correlación del modelo.

A fin de visualizar las medias de los niveles de glucosa sérica determinados en este trabajo en función de HALO, así como también las curvas cosenoidales que mejor ajustan a dichos puntos, se procedió a representarlos en forma gráfica (Figura 17) para las cuatro estaciones, haciendo uso de los coeficientes calculados en Tabla 25.

En lo que respecta a los coeficientes de correlación, se han obtenido valores que se hallan comprendidos entre 0,91-0,98, siendo evidente el adecuado ajuste alcanzado mediante el ajuste en serie temporal. Haciendo uso de los valores de frecuencia calculados mediante el modelo de regresión no lineal, se determinaron los períodos de la variación diaria de la glucosa para las cuatro estaciones. En este análisis se han presentado ritmos diarios en las cuatro estaciones con períodos de 29:46 h (invierno), 20:11 h (primavera), 20:56 h (verano) y 20:11 (otoño). Estos resultados no coinciden con los valores reportados por Lefcourt y col. (1999) en su trabajo realizado con vacas en lactancia que se encontraban en cámaras climatizadas con temperatura ambiente de 19 °C y un régimen de luz oscuridad de 16:08 h, ya que dichos autores informan una periodicidad caracterizada por una frecuencia ultradiana.

En humanos, algunos estudios han sugerido una intervención de mecanismos endógenos de medición del tiempo en la regulación de la glucemia, pero esto aún es motivo de controversias. Variaciones circadianas fueron descritas por Floyd y col. (1974); Méjean y col. (1988) y Van Cauter y col. (1997) mientras Schlierf y Raetzer (1972) y Hautecouverture y col. (1974) no han encontrado variaciones diarias que se ajustan a ritmos circadianos.

Las máximas concentraciones de glucosa se observaron en invierno a las 21:18 HALO (03:65 h), en primavera a las 14:40 HALO (20:08 h), en verano a las 20:14 HALO (02:47 h) y en otoño a las 02:44 HALO (11:59 h). El mesor y la amplitud fueron mayores en invierno que en el resto de las estaciones.

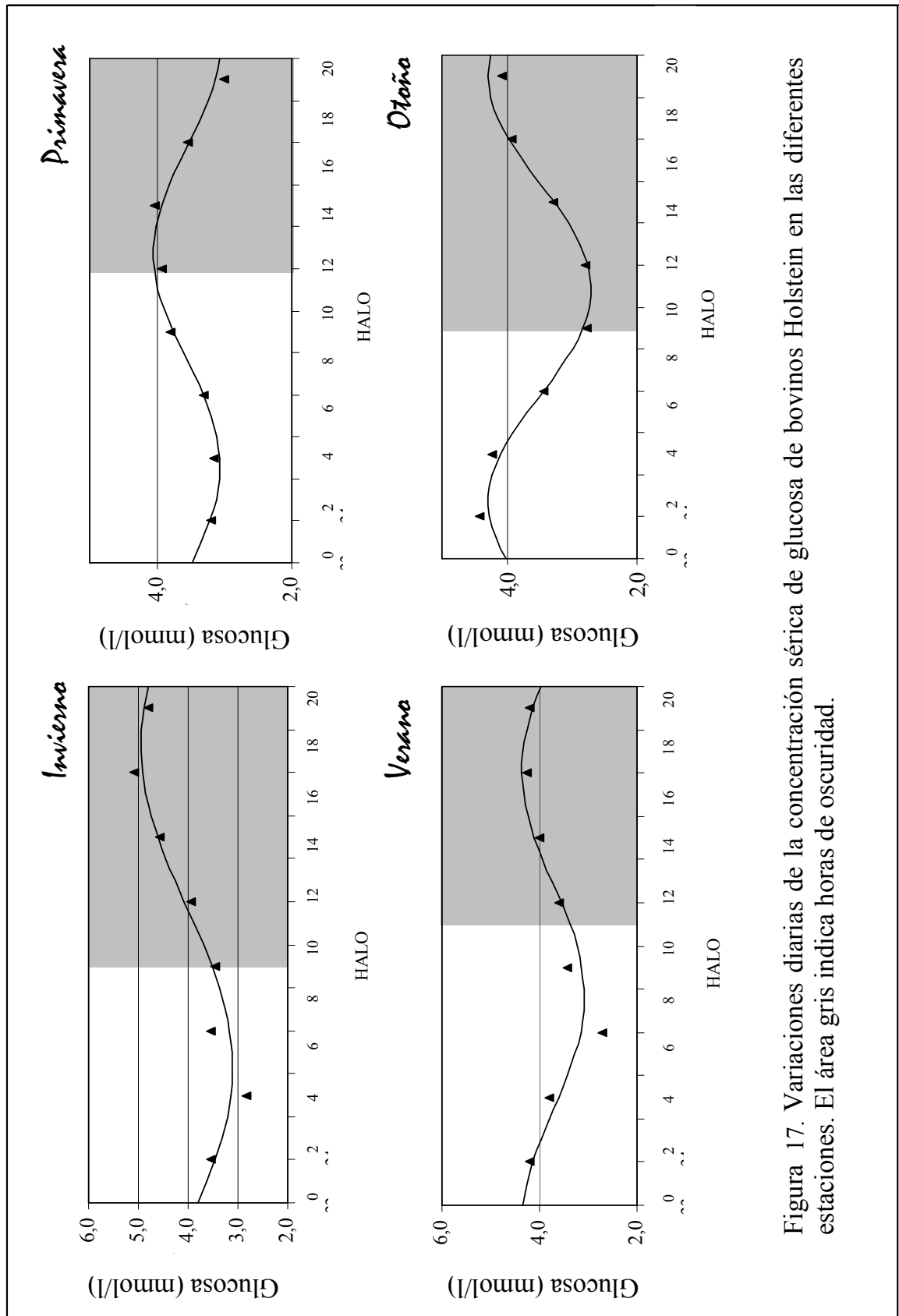
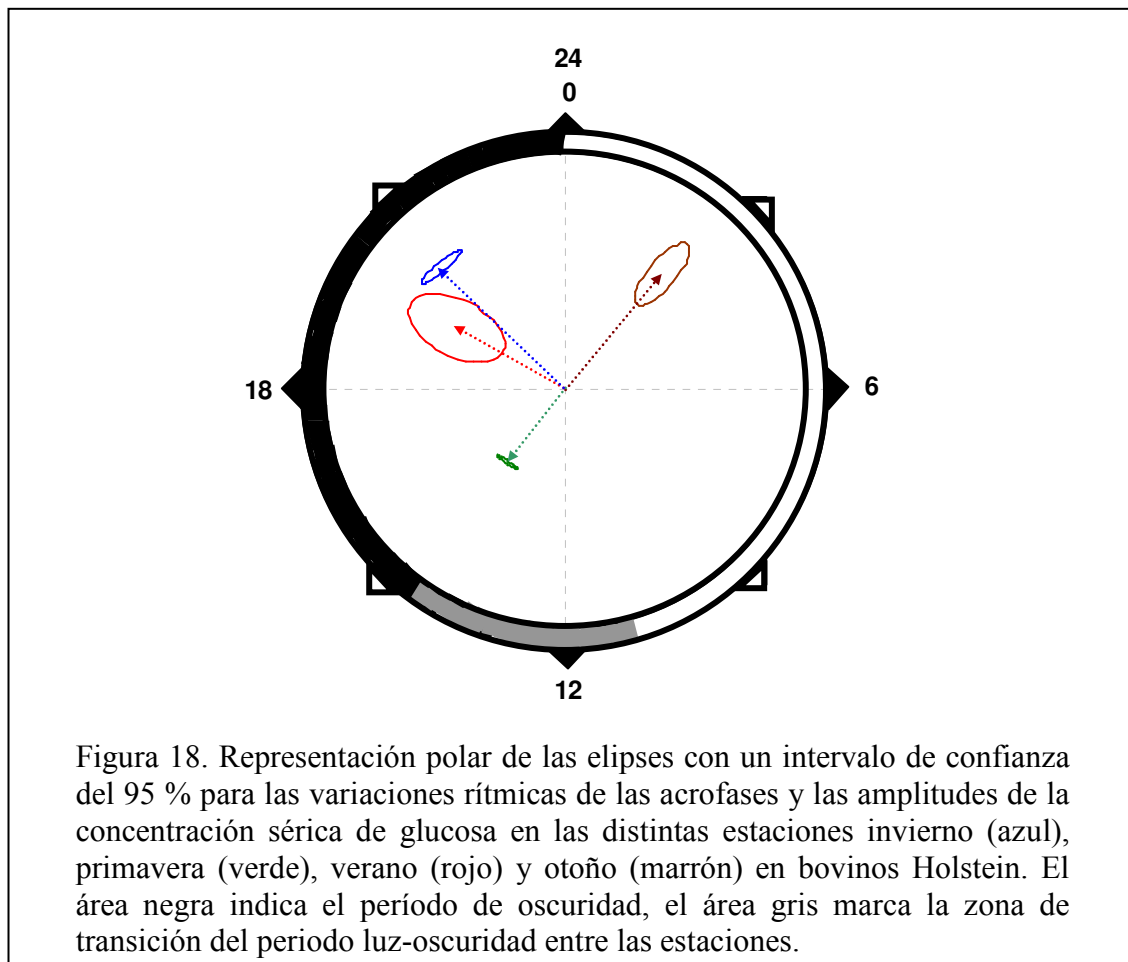


Figura 17. Variaciones diarias de la concentración sérica de glucosa de bovinos Holstein en las diferentes estaciones. El área gris indica horas de oscuridad.

Las acrofases reportadas en el presente estudio no coinciden con las calculadas por Swoyer y col. (1984) en humanos. Estos autores señalan ritmos circadianos con una acrofase próxima a las 06:30 + 1:5 h y una amplitud de 4.1 ± 1.6 % del mesor en hombres y mujeres adultos.

A fin de facilitar la interpretación de la distribución de las amplitudes y acrofases para cada estación del año, se construyó la Figura 18 que representa en coordenadas polares las elipses con un intervalo de confianza del 95 % para ambos descriptores de la ritmicidad de la glucosa.



En dicho gráfico se aprecia que existen diferencias significativas entre las amplitudes y acrofases registradas en las cuatro estaciones, además resulta evidente que

las variaciones registradas corresponden a ritmos biológicos estadísticamente significativos, debido a que ninguna de las elipses incluye el centro de la esfera.

La cantidad y composición de lípidos que circulan en la sangre bovina son dependientes de diversas variables fisiológicas, tales como naturaleza de la dieta, momento de alimentación, edad, raza, preñez, estado de lactación (Christie, 1981). Aunque algunos estudios han caracterizado cambios lipídicos que ocurren en vacas lactantes (Christie, 1981), existen pocos trabajos sobre variaciones circadianas de la concentración plasmática de lípidos en bovinos.

Los valores de colesterol y triglicéridos encontrados están dentro de los rangos fisiológicos, según Meyer y Harvey (2000) dichos límites presentan un rango de 2,26-6,60 mmol/L y 0-0,154 μ mol/L, respectivamente.

En este estudio no se detectaron diferencias diarias en la concentración plasmática de colesterol y triglicéridos, concordando con los resultados de Bitman y col. (1989) quienes midieron las variaciones en los niveles séricos de colesterol, esteres de colesterol, ácidos grasos libres y triglicéridos durante un período de 24 horas en vacas en lactación.

Cuando se comparan los ritmos de la glucosa hallados en este trabajo para bovinos Holstein con otras especies animales, se observan marcadas diferencias. Así, un estudio realizado con burros por Piccione y col. (2003a) revela variaciones diarias en la temperatura corporal y en las concentraciones plasmática de glucosa, triglicéridos y lípidos totales. Las acrofases de todos estos parámetros tuvieron lugar entre las 19:20 a 20:24 h.

En ratas, a pesar de la existencia de ritmo circadiano en la síntesis hepática de colesterol, no se observan ritmos diarios en la concentración de colesterol en hígado, ni en plasma (Rao y Ramasarma, 1971). Ramasarma, (1976) encontró comportamiento circadiano en la actividad de la coenzima hydroxymethylglutaryl reductasa en hígado de ratas. La actividad máxima de esta enzima y por ende la mayor síntesis de colesterol

ocurre hacia el final del día, alcanzando un pico alrededor de las 24:00 h., para decrecer luego en forma gradual durante la noche, alcanzando su nivel más bajo alrededor de las 12:00 h.

Los cambios en la concentración de colesterol hepático y plasmático no se corresponden con las modificaciones observadas para los productos lipídicos de la síntesis enzimática. Por ello, este hecho dificulta la interpretación fisiológica de los ritmos circadianos en la biogénesis de colesterol hepático.

En bovinos, podría suceder un comportamiento similar al observado en ratas, al existir una variación circadiana en la síntesis o utilización de los lípidos, que no va acompañada de una variación circadiana de los componentes lipídicos del plasma.

Con respecto a la bilirrubina total, se debe destacar que los valores determinados para este metabolito se encuentran cercanos a las concentraciones observadas por Meyer y Harvey (2000) y resultan inferiores a los niveles medidos por Coppo (2001). No se han hallado en la bibliografía disponible datos relativos a variaciones diarias de bilirrubina sérica en el bovino u otras especies.

IV.4. COMPONENTES NITROGENADOS

La Tabla 26 resume los estadísticos “F” y “p” determinados mediante la aplicación del ANOVA-MR a los principales componentes nitrogenados del suero de bovinos Holstein.

Tabla 26. Resultados del Análisis de la Varianza para evaluar los efectos de la categoría de bovinos, estación y HALO sobre componentes nitrogenados del suero

Componente nitrogenado	Efectos					
	Categoría		Estación		HALO	
	Valor “F”	Valor “p”	Valor “F”	Valor “p”	Valor “F”	Valor “p”
Proteínas (g/l)	8,47	0,0002	10,22	0,0001	27,29	0,0001
Albúminas (g/l)	3.46	0,0322	32.80	0,0001	10,71	0,0001
Urea (mmol/l)	11,65	0,0001	171,09	0,0001	0,23	0,6316
Creatinina (µmol/l)	81.29	0,0001	11617.42	0,0001	335.13	0,0001

En dicha tabla se puede apreciar que la estación del año y categoría afectó en forma significativa ($p < 0,05$) a todos los componentes nitrogenados. Con respecto al factor HALO, su efecto no resultó significativo ($p < 0,05$) solamente para urea.

Para evaluar el efecto de la categoría bovina y la estación del año sobre las medias de los componentes nitrogenados (proteína, albúminas, ácido úrico, urea y creatinina) en suero de bovinos adultos se construyó la Tabla 27.

Como indica dicha Tabla, el promedio obtenido para proteínas totales en las diferentes estaciones en bovinos, no se apartó de los rangos reportados por otros autores 59-77 g/l (Meyer y Harvey, 2000), 69-78 g/l (Coppo, 2001), pero fue más bajo que el comunicado por Althaus y col. (1992) y Corbellini (1983) en bovinos Holstein, quienes señalan rangos de 78,5-89,0 g/l y 72,9-88,2 g/l, respectivamente.

Tabla 27. Principales parámetros estadísticos de las concentraciones de los componentes nitrogenados del suero para diferentes categorías de bovinos y estaciones del año

Componente Nitrogenado	Estación	Vaquillonas		Vacas		Toros	
		X	DS	X	DS	X	DS
Proteínas (g/l)	Invierno	67,42 ^a _a	4,65	72,57 ^b _a	4,30	68,94 ^a _{ab}	4,14
	Primavera	69,86 ^a _{ab}	5,55	74,14 ^b _a	7,67	70,18 ^a _a	6,51
	Verano	66,70 ^a _a	9,04	68,41 ^b _b	13,59	66,85 ^b _b	8,42
	Otoño	70,68 ^b _b	9,74	72,63 ^a _a	10,46	74,06 ^c _c	7,22
Albúmina (g/l)	Invierno	37,16 ^a _a	2,67	37,69 ^b _a	2,27	37,62 ^b _a	2,11
	Primavera	38,28 ^a _b	1,33	38,95 ^b _b	1,07	38,93 ^b _b	1,54
	Verano	37,06 ^a _a	2,58	36,96 ^a _c	1,54	37,96 ^b _a	1,07
	Otoño	38,90 ^a _b	1,35	38,91 ^a _b	1,03	38,64 ^a _b	1,07
Urea (mmol/l)	Invierno	2,70 ^a _a	0,50	2,72 ^a _a	0,70	3,28	0,66 ^b _a
	Primavera	4,15 ^a _b	0,47	3,83 ^b _b	0,44	4,02	0,76 ^{ab} _b
	Verano	3,94 ^a _c	0,37	3,69 ^b _b	0,35	3,99	0,56 ^a _b
	Otoño	4,25 ^b _b	0,60	4,32 ^c _c	0,42	4,36	0,56 ^c _c
Creatinina (µmol/l)	Invierno	91,42 ^a _a	2,49	90,81 ^b _a	2,15	90,15 ^b _a	2,04
	Primavera	84,79 ^a _b	1,38	84,48 ^{ab} _b	1,33	84,03 ^b _b	1,45
	Verano	80,70 ^a _{ab}	0,93	80,45 ^a _c	0,93	79,96 ^b _c	1,16
	Otoño	75,33 ^a _a	1,57	74,85 ^{ab} _d	1,80	74,19 ^b _d	2,29

^{a, b, c}: Diferentes superíndices para valores medios de una misma fila indican diferencias significativas a un nivel de $p < 0,05$

^{a, b, c, d}: Diferentes subíndices para valores medios de una misma columna indican diferencias significativas a un nivel de $p < 0,05$ para cada variable bioquímica.

En el presente trabajo, las proteínas totales disminuyeron en los días previos al parto (invierno) y se incrementaron al inicio de la lactación (primavera). Este hecho fue señalado por otros autores tales como Oldham y col. (1979); Blum y col. (1983), quienes reportan que las proteínas totales del plasma luego del parto aumentan rápidamente, alcanzando sus niveles máximos entre los 30 a 100 días de lactación, luego en forma progresiva disminuyen levemente.

Con el propósito de describir los parámetros rítmicos en los niveles de proteínas totales séricas, se utilizó al igual que en las otras variables, el modelo no lineal de tipo cosenoidal. Debido que se observó un efecto significativo en categoría, estación y HALO, el análisis estadístico se aplicó a los datos de los 6 animales en las diferentes categorías y estaciones del año. En la Tabla 28 se presentan los valores medios y error

standard relativas a los componentes rítmicos de la variación sérica de los niveles de proteínas totales.

Tabla 28. Modelos rítmicos diarios determinados mediante un ajuste no lineal de una función coseno que representan las variaciones temporales de los niveles séricos de proteínas totales de bovinos Holstein

		Proteínas = A₀ + A₁ * Cos (w * t + Φ)									
Estación	Categoría	A ₀		A ₁		W		Φ		R	
		X	ES	X	ES	X	ES	X	ES		
Invierno	Vaquillona	67,465	0,212	4,530	0,295	0,038	0,002	05:29	00:67	0,99	
	Vaca	72,460	0,703	3,624	0,874	0,044	0,006	04:70	02:29	0,90	
	Toro	68,813	0,076	4,661	0,112	0,047	0,005	06:22	00:15	0,99	
Primavera	Vaquillona	68,730	3,562	6,684	2,922	0,035	0,015	11:40	04:91	0,93	
	Vaca	75,329	0,994	7,395	1,135	0,050	0,005	11:35	01:46	0,96	
	Toro	70,397	0,881	5,870	0,875	0,043	0,006	09:25	01:51	0,96	
Verano	Vaquillona	66,378	1,267	6,714	1,565	0,045	0,006	04:70	02:16	0,91	
	Vaca	66,972	2,711	9,984	3,370	0,052	0,009	05:12	02:31	0,81	
	Toro	66,623	0,875	7,176	1,219	0,044	0,004	05:10	01:31	0,95	
Otoño	Vaquillona	70,578	1,601	5,638	2,379	0,046	0,008	06:17	02:70	0,77	
	Vaca	71,800	0,335	5,582	0,463	0,067	0,002	06:46	00:38	0,99	
	Toro	74,042	0,968	3,754	1,255	0,071	0,010	08:57	02:02	0,83	

A₀; A₁=mmol/l; w=1/h; t=h; Φ=h

X: Media muestral, ES: Error Standard, R: coeficiente de correlación del modelo.

La representación gráfica de los valores medios de los datos experimentales registrados durante 24 h conjuntamente con las curvas obtenidas mediante la aplicación del modelo cosenoidal, se muestra en Figura 19.

Las medias determinadas en forma experimental se ajustan adecuadamente a los valores estimados a partir de dicho modelo, tal como se evidencia en esta Figura 17, debido a que los coeficientes de correlación (Tabla 28) fueron elevados al estar comprendidos entre 0,81 y 0,99.

A partir de los resultados de las frecuencias (W) expuestas en la Tabla 28, se calcularon los períodos (T) correspondientes a los ritmos de la concentración sérica de proteínas totales registradas en las diferentes categorías durante las cuatro estaciones del año (Tabla 29).

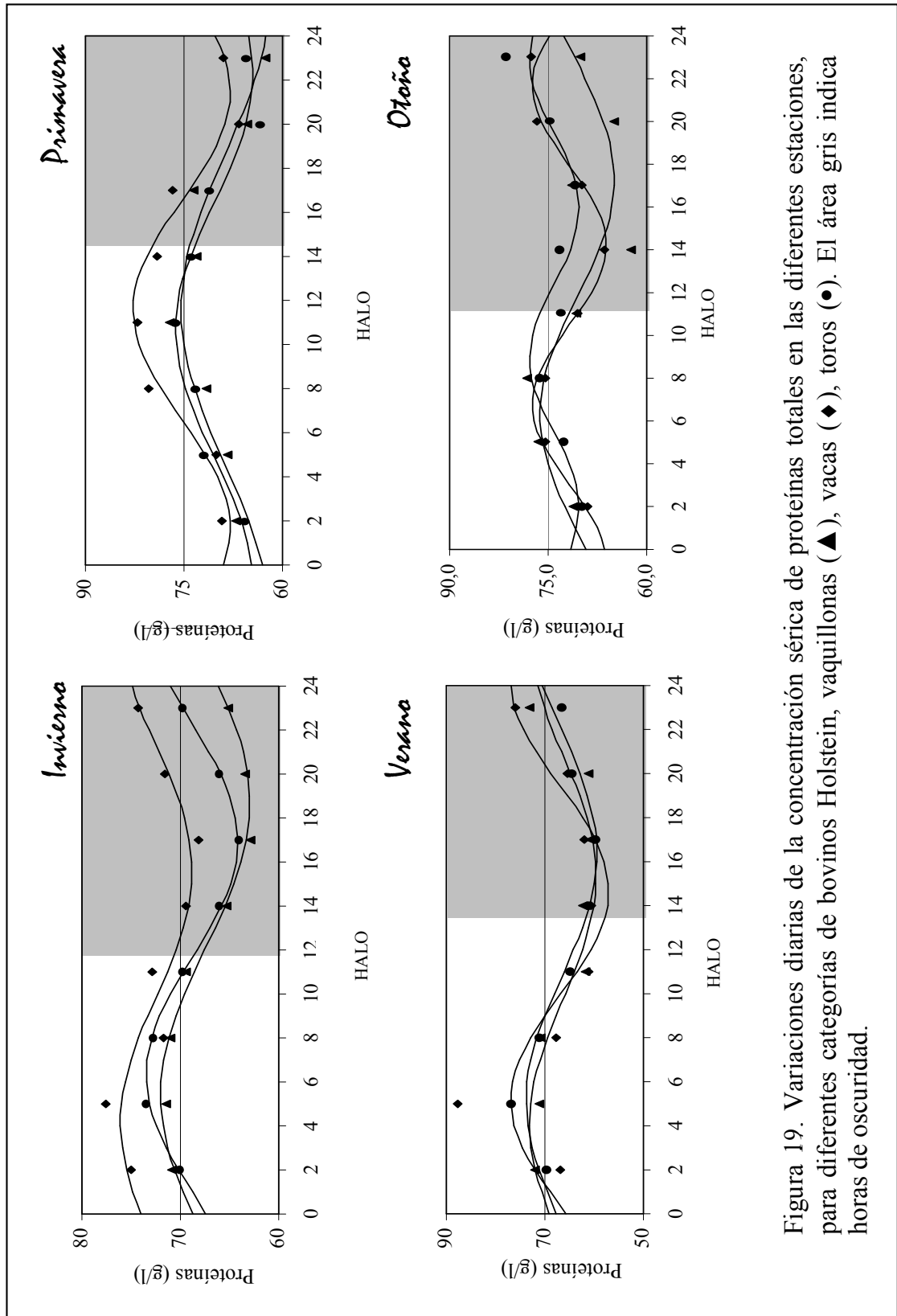


Figura 19. Variaciones diarias de la concentración sérica de proteínas totales en las diferentes estaciones, para diferentes categorías de bovinos Holstein, vaquillonas (▲), vacas (◆), toros (●). El área gris indica horas de oscuridad.

Tabla 29. Valores medios de los períodos de los ritmos de proteínas totales en sangre de bovinos Holstein

Categoría	Invierno	Primavera	Verano	Otoño
Vaquillona	26:30	28:17	22:26	21:58
Vaca	22:55	19:49	19:09	14:55
Toro	21:17	23:05	22:31	14:01

La variación en la concentración de proteína total en suero de bovinos presenta una periodicidad diaria, con valores medios de períodos comprendidos entre 19:09 h y 28:17 h (Tabla 29), a excepción de los registros en otoño en los grupos de vacas y toros, que fue más bajo.

Los perfiles que expresan las variaciones diarias de la concentración sérica de proteínas totales en vaquillonas, vacas y toros resultaron similares para cada estación (Figura 19). El ritmo diario en la concentración de proteínas totales presenta su acrofase durante las horas diurnas, existiendo diferencias estacionales principalmente en la primavera (Tabla 28).

En la bibliografía disponible no se han encontrado valores referidos a las variaciones diarias de los niveles de proteínas totales en sangre de vacas lecheras. Sin embargo, en otras especies como los équidos, Greppi y col. (1996) informan variaciones circadianas en la concentración plasmática de proteínas totales, con una acrofase que se observa a las 20 horas y su batifase a las 12 horas, difiriendo con los resultados encontrados en este trabajo.

Los ritmos hallados para las proteínas resultan independientes de los ritmos determinados para el hematocrito. Estas discrepancias estarían reflejando, probablemente, una variación temporal de la síntesis de proteicas en el hígado (Touitou y col., 1986)

En la representación polar (Figura 20) se puede observar las acrofases y las amplitudes estimadas mediante el método cosenoidal junto con las elipses que poseen un intervalo de confianza de un 95%. La presentación de las acrofases exhibe gran

homogeneidad tanto en el invierno como en el verano. Exceptuando a los toros durante el invierno, las vacas y vaquillonas no presentaron diferencias significativas. El grupo vaquillona mostró un gran intervalo de confianza para primavera y otoño interceptando sus elipses a las otras dos categorías, poniendo de manifiesto la ausencia de diferencias estadísticas. En primavera, la elipse correspondiente a vaquillonas incorpora al cero indicando que no existe un ritmo estadísticamente significativo. Respecto a las categorías vacas y toros, éstas manifestaron diferencias significativas en primavera y otoño.

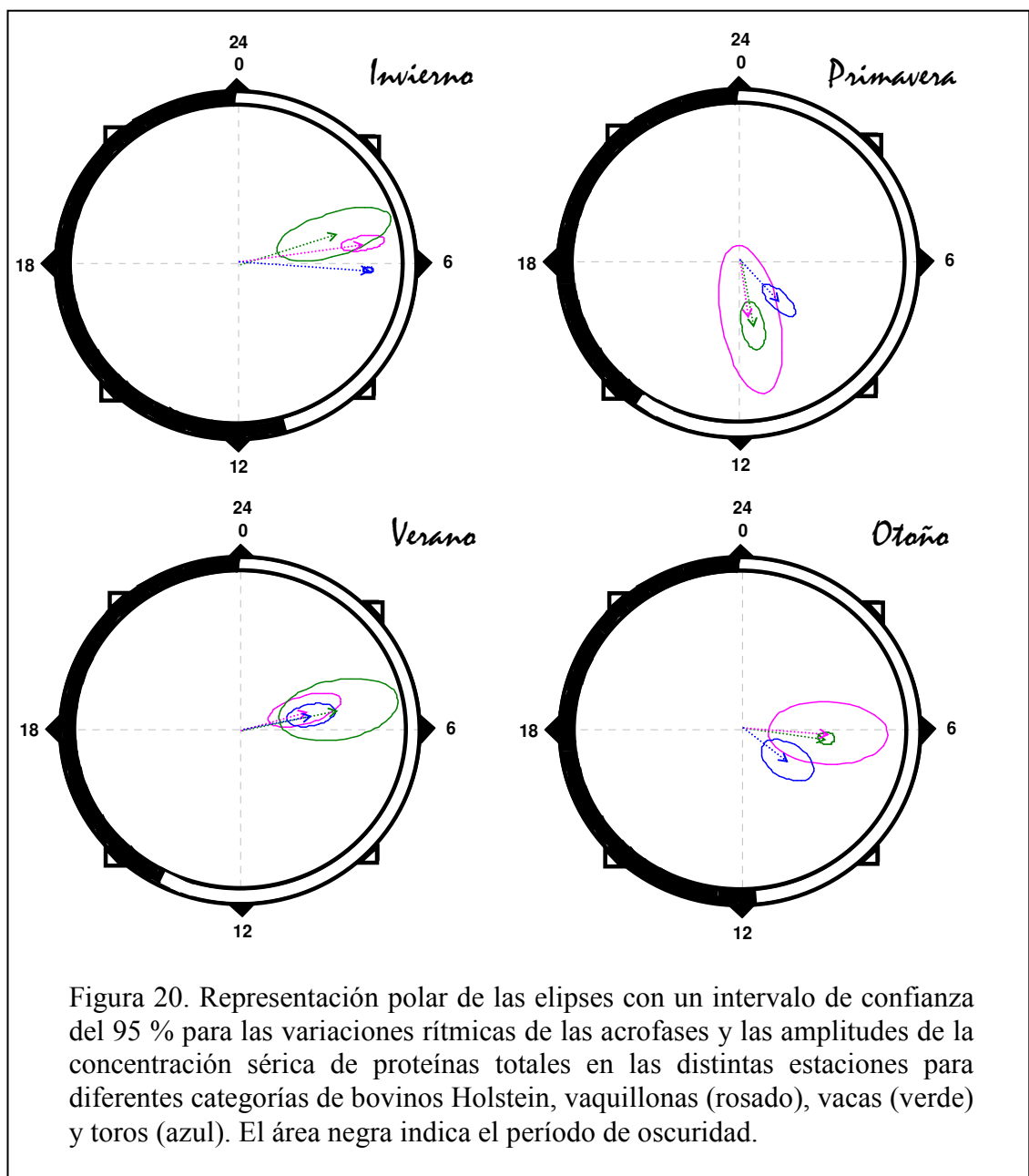


Figura 20. Representación polar de las elipses con un intervalo de confianza del 95 % para las variaciones rítmicas de las acrofases y las amplitudes de la concentración sérica de proteínas totales en las distintas estaciones para diferentes categorías de bovinos Holstein, vaquillonas (rosado), vacas (verde) y toros (azul). El área negra indica el período de oscuridad.

Los valores de albúmina sérica obtenidos en ese trabajo se hallan comprendidos dentro de los amplios rangos de 34-40 g/l (Corbellini, 1983); 27-43 g/l (Meyer y Harvey, 2000) y 30-38 g/l (Coppo, 2001), siendo levemente superiores al rango 28-34 señalado por Althaus y col. (1992).

Durante la fase de la primavera, el grupo de vacas al inicio de lactación presentó una media máxima de albúmina, coincidiendo con los reportes de Blum y col., (1983) al informar que la albúmina sérica de vacas aumenta en los primeros 100 días de lactación, especialmente durante la segunda lactación y luego disminuye progresivamente

Siguiendo la metodología descrita en el apartado de material y métodos, como los datos correspondientes a albúmina mostraron diferencias significativas en función de HALO, se efectuó el ajuste mediante una función coseno. Debido a que esta variable presentó además efecto significativo para las categorías y estaciones del año, el tratamiento estadístico se aplicó a los grupos de 6 animales en cada categoría y estación del año (12 modelizaciones). En la Tabla 30 se exponen los principales descriptores estadísticos obtenidos mediante la modelización de las variaciones rítmicas de la concentración sérica de albúmina.

La representación gráfica de los valores medios de los niveles de albúmina junto al ajuste logrado están representados en la Figura 21. En este caso, al igual que en los anteriores, los datos experimentales se ajustaron adecuadamente a los valores estimados a partir de dicho modelo, con elevados valores de correlación (Tabla 30). Además, en la Tabla 22 se pueden observar los períodos correspondientes a los ritmos medidos en las diferentes estaciones y categorías, calculadas a partir de los valores de frecuencia.

Tabla 30. Modelos rítmicos diarios determinados mediante un ajuste no lineal de una función coseno que representan las variaciones temporales de los niveles séricos de albúmina de bovinos Holstein

		Albúminas = $A_0 + A_1 * \text{Cos} (w * t + \Phi)$									
Estación	Categoría	A_0		A_1		W		Φ		R	
		X	ES	X	ES	X	ES	X	ES		
Invierno	Vaquillona	37,101	0,465	2,216	0,455	0,043	0,008	02:44	02:62	0,86	
	Vaca	37,783	0,440	1,707	0,404	0,039	0,009	02:14	03:44	0,91	
	Toro	37,322	0,286	1,722	0,327	0,051	0,007	03:20	01:81	0,94	
Primavera	Vaquillona	38,290	0,238	0,528	0,333	0,043	0,014	08:13	04:32	0,63	
	Vaca	38,868	0,130	0,571	0,107	0,036	0,007	10:05	02:02	0,96	
	Toro	39,007	0,156	0,796	0,178	0,046	0,007	10:34	01:94	0,91	
Verano	Vaquillona	36,942	0,255	1,729	0,279	0,033	0,006	06:19	02:20	0,95	
	Vaca	36,904	0,161	1,189	0,193	0,037	0,005	07:20	01:61	0,95	
	Toro	37,958	0,149	0,688	0,209	0,038	0,008	06:12	02:87	0,97	
Otoño	Vaquillona	38,898	0,062	0,831	0,091	0,043	0,002	06:03	00:81	0,98	
	Vaca	38,934	0,160	0,584	0,237	0,048	0,008	08:10	02:30	0,78	
	Toro	38,611	0,076	0,600	0,090	0,036	0,005	06:57	01:66	0,96	

A_0 ; A_1 =mmol/l; $w=1/h$; $t=h$; $\Phi=h$

X: Media muestral, ES: Error Standard, R: coeficiente de correlación del modelo.

Tabla 31. Valores medios de los períodos de los ritmos de albúminas en sangre de bovinos Holstein

Categoría	Invierno	Primavera	Verano	Otoño
Vaquillona	23:12	23:14	30:10	23:24
Vaca	25:22	27:56	27:06	21:03
Toro	19:29	21:32	26:15	28:09

En la Tabla 31 se puede comprobar que las variaciones en la concentración de albúmina sérica en todos los casos presentaron una ciclicidad diaria, ya que los períodos obtenidos se encuentran dentro del rango de 16-32 h (Reinberg y Halberg, 1971).

Como puede observarse en la Figura 21, las curvas rítmicas construidas para las cuatro estaciones del año y en las diferentes categorías de animales son muy similares entre sí. Los mayores valores del mesor se presentan en otoño y primavera, a diferencia de las amplitudes que fueron mayores en el invierno y el verano. Con respecto a las acrofases, al igual que sucede en proteínas, se producen durante las horas diurnas.

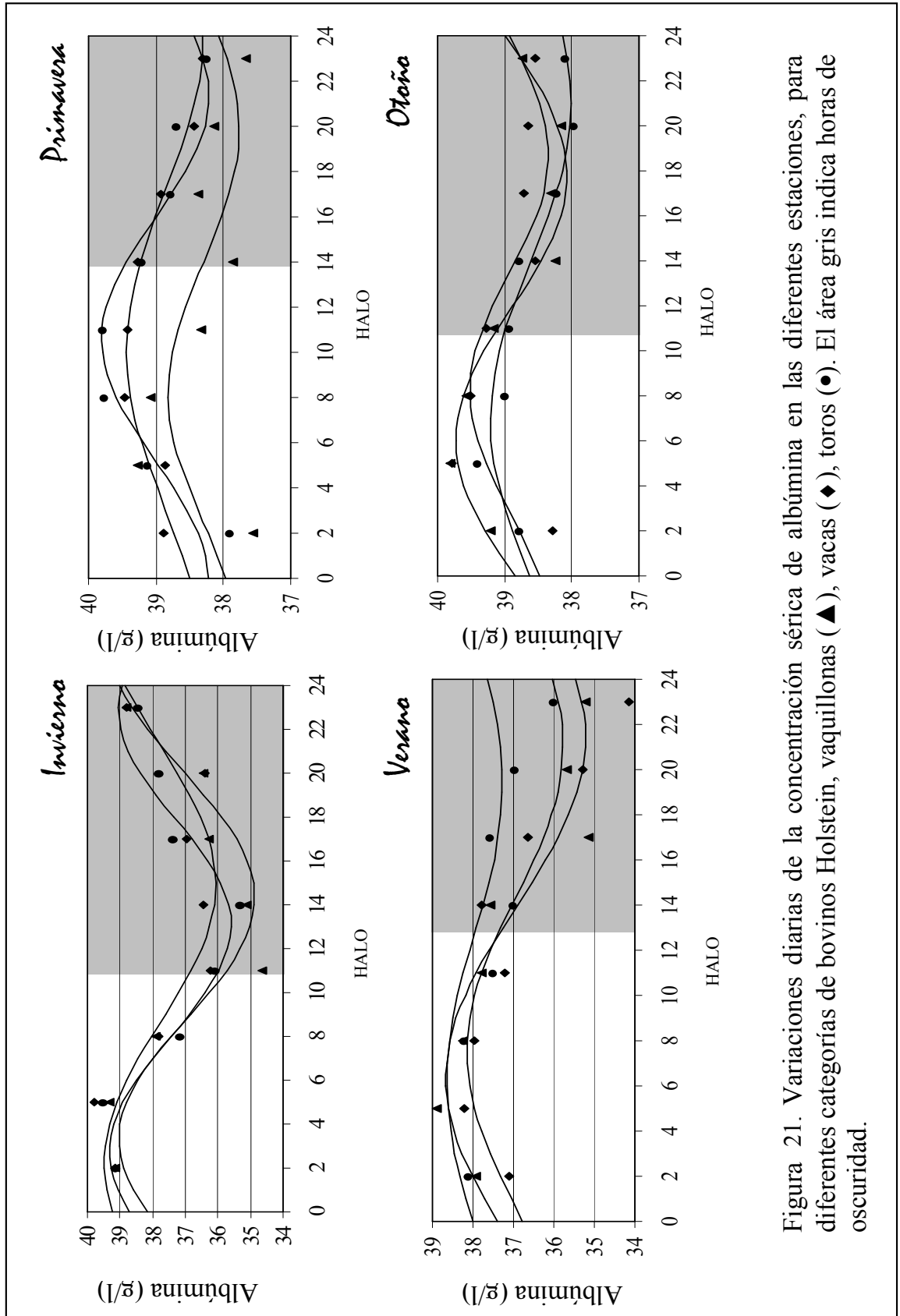


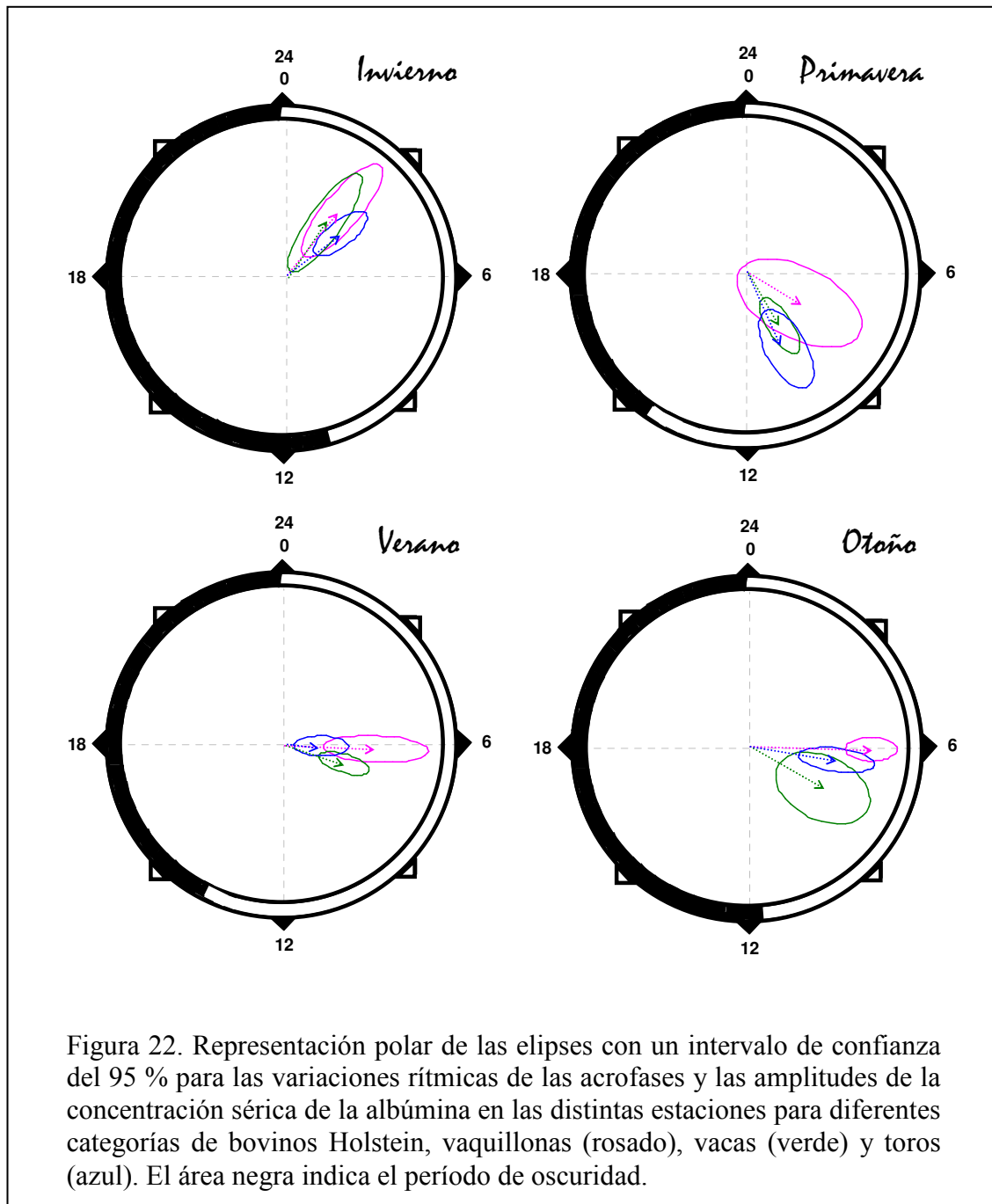
Figura 21. Variaciones diarias de la concentración sérica de albúmina en las diferentes estaciones, para diferentes categorías de bovinos Holstein, vaquillonas (▲), vacas (◆), toros (●). El área gris indica horas de oscuridad.

Similar a lo que acontece para proteínas totales, la comparación con resultados obtenidos por otros autores resulta muy difícil, ya que en la bibliografía no existen estudios disponibles acerca de variaciones cronobiológicas en albúminas de bovinos, limitándose los escasos estudios encontrados a evaluar los ritmos en los niveles de albúmina humana.

Así, algunos estudios han descrito ritmos circadianos en proteínas plasmáticas en humanos, especialmente de albúmina y α -1-glicoproteína, las dos proteínas involucradas en la unión y transporte de drogas insolubles en medio acuoso (Reinberg y col., 1977; Bruguerolle y col., 1986, Focan y col., 1988; Kanabrocki y col., 1988).

Coincidente con estos resultados, Touitou y col. (1986) encontraron que en estas proteínas, durante las primeras horas de la tarde se presenta la máxima concentración, seguido de una disminución progresiva durante la noche. La diferencia entre la concentración máxima y la mínima es de un 10% en adultos jóvenes pero puede incrementarse hasta un 20% en sujetos ancianos. Los ritmos de estas proteínas son independientes de los ritmos del hematocrito plasmático y probablemente reflejen la variación temporal de la síntesis de proteicas a nivel del hígado.

En la representación polar (Figura 22) se puede observar los valores de las acrofases y sus correspondientes amplitudes estimadas mediante el método el ajuste cosenoidal, acompañados de las elipses de un 95 % de confianza. Las acrofases en invierno presentan una pequeña variación no significativa con respecto a primavera verano y otoño, sin embargo, todas ellas se encuentran claramente en la fase lumínica. Las elipses del intervalo de confianza muestran la homogeneidad entre grupos, exceptuando a las vacas y vaquillonas durante los meses de otoño que presentaron diferencias significativamente estadísticas ($p < 0,05$).



En forma similar a lo anteriormente expuesto para las proteínas, las elipses correspondientes al grupo de las vaquillonas durante la primavera, se caracterizan por incorporar el origen de coordenadas polares.

Además de manifestarse una gran similitud en la expresión de los datos cronobiológicos para ambos componentes nitrogenados, no se puede asegurar que el grupo vaquillonas presente una ciclicidad durante la primavera. Sin embargo, la evidencia de un comportamiento rítmico (95 % de confianza) para el resto de ajustes logrados para las proteínas y albúminas séricas (22 ajustes) hace pensar en errores de tipo experimentales o de medición

Con respecto a la urea, tercer componente nitrogenado de la Tabla 27, en el presente trabajo los valores séricos en bovinos bajo un sistema de pastoreo extensivo en base a alfalfa característico de la cuenca central santafecina, concordaron con las observaciones realizadas anteriormente por Corbellini (1983) y Coppo (2001) en este país. El promedio máximo de urea encontrado fue de 4,36 mmol/L, no correspondiéndose con los citados por Lefcourt y col. (1999) y Gustafsson y Palmquist (1993) quienes reportan rangos más elevados, comprendidos entre 11,21-15,03 mmol/ y 4,5-8,0 mmol/L, respectivamente.

Durante el invierno, se observaron los niveles significativamente más bajos en la concentración de urea para las tres categorías (Tabla 27). Esta disminución en los niveles de urea debido a un efecto estacional también fue informada por Wilhelm (1985).

Thomas y col. (1976); Manston y col. (1981); Clement y col. (1991) y Gustafsson y Palmquist (1993) describen cambios diarios en la concentración sérica de urea en animales alimentados una sola vez al día. En el presente trabajo, no se hallaron variaciones diarias, coincidiendo con las investigaciones de otros autores (Thomas y col., 1976; Folman y col, 1981) donde los animales tenían acceso permanentemente al alimento.

Lefcourt y col. (1999) realizaron un estudio con vacas en lactancia que se encontraban en cámaras climáticas a temperatura de 19 °C, régimen de luz:oscuridad de 16:8 h y recibían una vez al día una ración alimenticia a las 9 hora. Estos autores

determinaron variaciones diarias que se ajustan a un ritmo circadiano cosenoidal con concentraciones máximas de urea a las 10:34 horas y amplitud de 3,8 mmol/L.

En lo que respecta al cuarto componente nitrogenado, la creatinina sérica, se debe destacar que los valores de la Tabla 27 son similares al rango 62-97 $\mu\text{mol/l}$ considerado normal por Meyer y Harvey (2000).

La aplicación de un ajuste de tipo cosenoidal a la variación de creatinina a lo largo del día, se ejecutó a los valores de 6 animales agrupados según la categoría y estaciones del año, ya que además de presentar efecto significativo para HALO, también lo tuvieron para la categoría y la estación del año (Tabla 26).

En Tabla 32 se pueden observar los parámetros rítmicos calculados a partir del ajuste cosenoidal, mientras que en la Figura 23 se representa el comportamiento de las concentraciones medias de creatinina a las diferentes HALO, clasificados por grupos de bovinos y estaciones, junto a sus respectivos ajustes. De la comparación de los valores medidos y los estimados se puede visualizar la satisfactoria modelización obtenida para este componente nitrogenado, que presentaron coeficientes de correlación (Tabla 32) comprendidos entre 0,83 para las vaquillonas en el invierno) y 0,97 para las vacas en el otoño.

Por otra parte, se puede observar tanto en Tabla 32 como en Figura 21 que los comportamientos rítmicos que caracterizan a la creatinina en vaquillonas, vacas y toros en cada estación fueron similares, presentando sus acrofases durante la tarde. Con respecto al mesor, en el invierno se observó el mayor valor, mientras que las amplitudes fueron mayores en invierno y otoño.

Tabla 32. Modelos rítmicos diarios determinados mediante un ajuste no lineal de una función coseno que representan las variaciones temporales de los niveles de creatinina sérica de bovinos Holstein

		Creatinina = A₀ + A₁ * Cos (w * t + Φ)									
Estación	Categoría	A ₀		A ₁		W		Φ		R	
		X	ES	X	ES	X	ES	X	ES		
Invierno	Vaquillona	91,707	0,750	2,893	0,970	0,048	0,009	10:40	02:40	0,83	
	Vaca	91,103	0,594	2,579	0,726	0,048	0,008	10:34	02:25	0,87	
	Toro	90,516	0,621	2,379	0,715	0,050	0,010	11:24	02:78	0,86	
Primavera	Vaquillona	84,877	0,339	1,768	0,377	0,044	0,007	10:17	01:87	0,92	
	Vaca	84,628	0,338	1,662	0,388	0,046	0,007	10:37	02:02	0,91	
	Toro	84,298	0,433	1,656	0,531	0,051	0,010	11:13	02:68	0,84	
Verano	Vaquillona	80,773	0,284	1,120	0,315	0,045	0,009	10:26	02:49	0,87	
	Vaca	80,486	0,322	1,131	0,286	0,043	0,011	11:13	02:97	0,89	
	Toro	80,189	0,105	1,344	0,123	0,051	0,003	11:31	00:84	0,87	
Otoño	Vaquillona	74,466	1,460	2,660	1,287	0,030	0,012	10:57	04:28	0,96	
	Vaca	74,470	0,705	2,631	0,570	0,036	0,008	11:09	02:43	0,97	
	Toro	73,950	1,104	2,972	0,860	0,039	0,012	11:52	03:73	0,95	

A₀; A₁=mmol/l; w=1/h; t=h; Φ=h

X: Media muestral, ES: Error Standard, R: coeficiente de correlación del modelo.

El análisis de los valores medios de los períodos (Tabla 33) de las oscilaciones de creatinina calculados a partir de los valores de frecuencia (Tabla 32) indican que este componente presenta variaciones que se ajustan a un ritmo diario.

Tabla 33. Valores medios de los períodos de los ritmos de albúminas en sangre de bovinos Holstein

Categoría	Invierno	Primavera	Verano	Otoño
Vaquillona	20:47	22:35	22:16	33:03
Vaca	20:40	21:31	23:05	27:47
Toro	20:00	19:26	19:34	25:57

Estudios realizados en humanos por Baghdassarian y col. (1990) señalan que los niveles plasmáticos de creatinina muestran un ritmo circadiano con una acrofase en la segunda mitad del sueño, mientras que Greppi y col. (1996), en un trabajo realizado en equinos, no encontraron variaciones diarias en las concentraciones de creatinina.

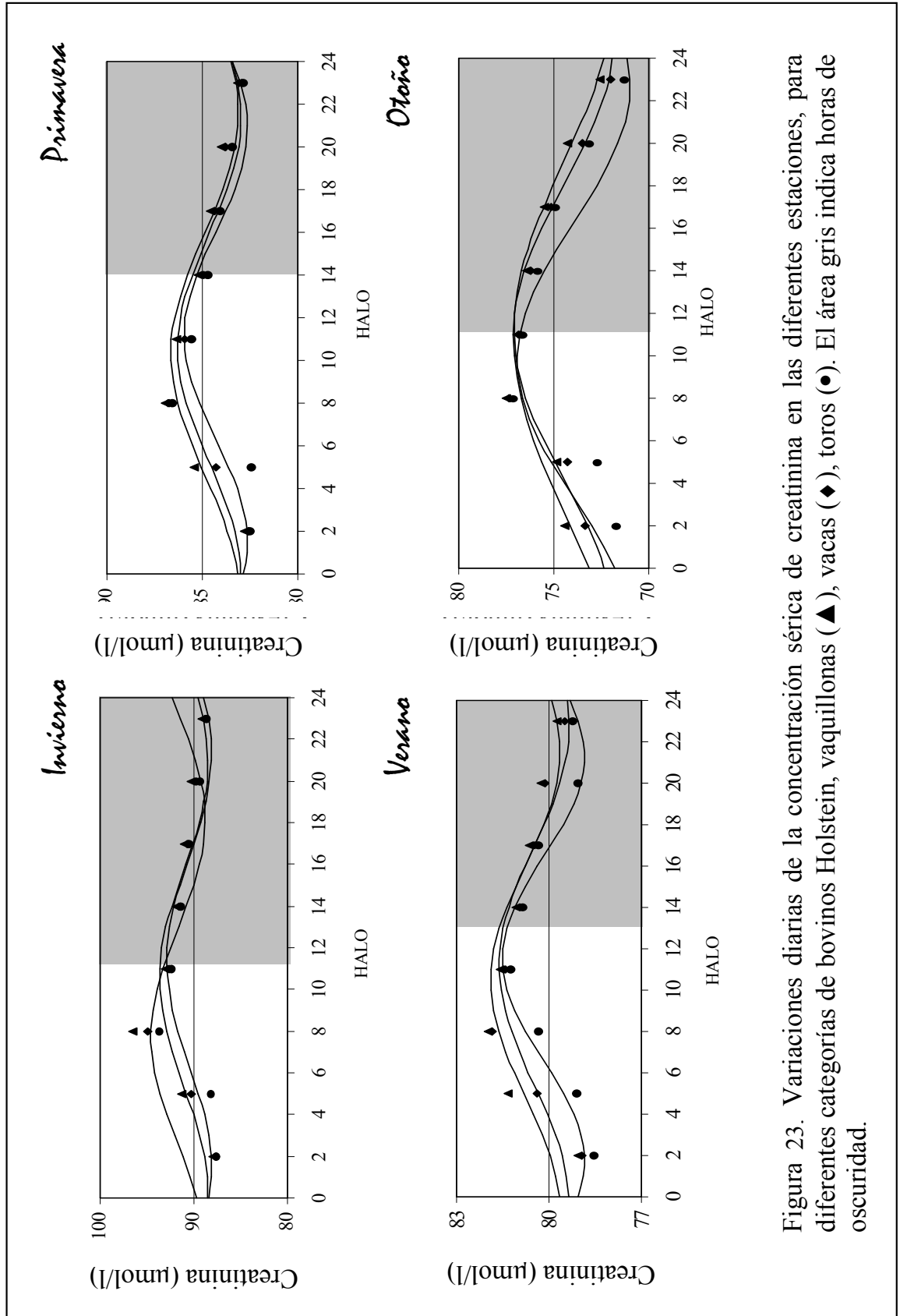
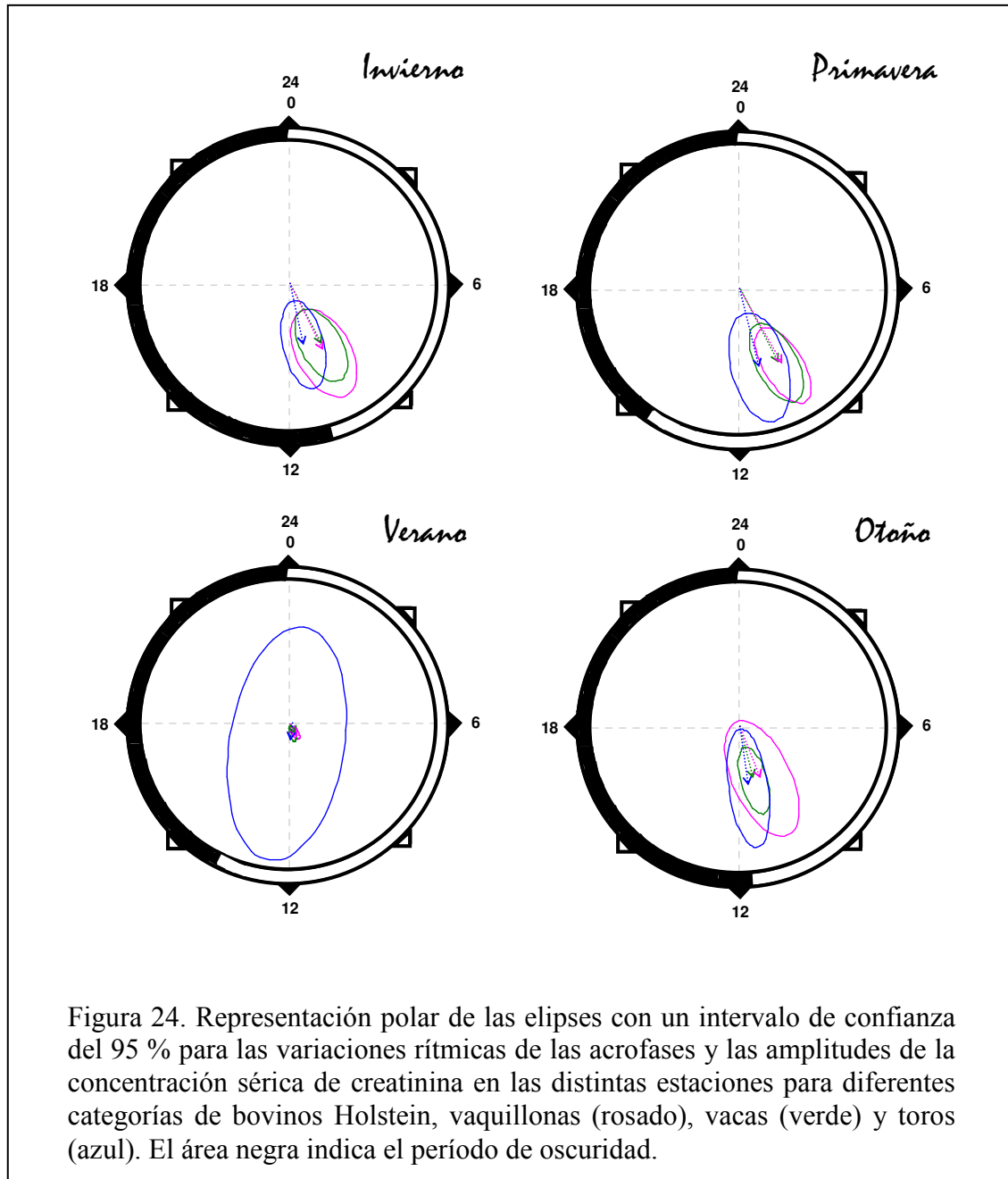


Figura 23. Variaciones diarias de la concentración sérica de creatinina en las diferentes estaciones, para diferentes categorías de bovinos Holstein, vaquillonas (▲), vacas (◆), toros (●). El área gris indica horas de oscuridad.



La Figura 24 representa en coordenadas polares las elipses que poseen un intervalo de confianza del 95 % y un centro en la acrofase y la amplitud. Dichas elipses ponen de manifiesto una gran similitud entre los grupos y las estaciones mostrando la ausencia de diferencias estadísticas, exceptuando el grupo toros en verano que exhibe una elipse que incorpora al centro. Interpretando este hecho puntual dentro del contexto general observado para el comportamiento rítmico de la creatinina sérica, se puede

pensar más bien en posibles errores de tipo operacionales, errores atribuibles a las mediciones, o escasa cantidad de individuos en el grupo (6 toros) más que en una ausencia de un comportamiento cíclico.

IV.5. ENZIMAS SÉRICAS

La aplicación del Análisis de la Varianza utilizado para evaluar los efectos de la categoría (toros, hembras 1ra lactancia y hembras 3ra lactancia), la estación del año y HALO sobre las determinaciones de actividad enzimática, señaló que la estación del año afectó en forma significativa ($p < 0,05$) la actividad enzimática de AST, ALT, LDH y amilasa (Tabla 34), mientras que la categoría mostró efecto significativo sobre AST, ALT y ALP. Con respecto al factor HALO, su efecto resultó significativo ($p < 0,05$) sobre AST, ALT, ALP y amilasa.

Tabla 34. Resultados del Análisis de la Varianza para evaluar los efectos de la categoría de bovinos, estación y HALO sobre las variables en la actividad enzimática

Enzima	Efectos					
	Categoría		Estación		HALO	
	Valor “F”	Valor “p”	Valor “F”	Valor “p”	Valor “F”	Valor “p”
AST (U/l)	160,11	0,0001	47,41	0,0001	14,51	0,0001
ALT (U/l)	43,14	0,0001	54,31	0,0001	9,58	0,0021
ALP (U/l)	27,83	0,0001	2,13	0,0957	7,55	0,0062
Amilasa U/l)	1,30	0,2737	20,39	0,0001	5,26	0,0222

Con el propósito de evaluar el efecto de la categoría bovina y la estación del año sobre las variables enzimáticas en sangre de bovinos Holstein, se construyó la Tabla 35, donde se sintetizan los principales descriptores estadísticos.

La actividad enzimática de AST resultó similar a los valores considerados normales por Meyer y Harvey (2000) quienes reportan un rango de 48 a 100U/l para esta enzima, sin embargo, los valores hallados en ese trabajo son muy elevados con respecto a los considerados normales por otros autores, como por ejemplo Coppo y col. (2001) que obtiene un rango de 21-45 U/l o Corbellini y col. (1983) que informa niveles comprendidos entre 30-64 U/l.

Tabla 35. Principales parámetros estadísticos de las concentraciones de las variables enzimáticas del suero para diferentes categorías de bovinos y estaciones del año

Variable enzimática	Estación	Vaquillonas		Vacas		Toros	
		X	DS	X	DS	X	DS
AST (U/l)	Invierno	56,43 ^a _a	13,39	44,01 ^b _a	12,04	105,04 ^c _a	29,10
	Primavera	82,79 ^a _b	10,62	72,30 ^b _b	8,92	106,47 ^c _a	15,47
	Verano	60,31 ^a _b	12,76	72,16 ^b _b	14,47	77,49 ^b _b	22,81
	Otoño	58,07 ^a _b	19,27	59,36 ^a _c	14,61	75,04 ^b _b	18,81
ALT (U/l)	Invierno	25,77 ^{ab} _a	4,72	24,73 ^a _a	4,21	27,08 ^b _a	5,308
	Primavera	30,17 ^a _b	4,67	25,21 ^b _a	7,91	43,40 ^c _b	6,54
	Verano	23,84 ^a _a	8,36	25,54 ^{ab} _a	9,82	27,91 ^b _a	7,96
	Otoño	16,30 ^a _c	4,5205	15,58 ^a _b	9,58	26,26 ^b _a	5,65
ALP (U/l)	Invierno	63,26 ^a _a	3,65	51,35 ^b _a	5,47	63,15 ^a _a	4,70
	Primavera	59,40 ^a _b	5,42	53,06 ^b _a	7,54	63,62 ^c _a	7,28
	Verano	59,24 _b	10,19	57,24 _b	8,34	60,53 _b	8,58
	Otoño	59,68 _b	7,91	62,86 _c	9,46	59,91 _b	6,37
Amilasa (U/l)	Invierno	127,73 _{ab}	65,22	118,36 _a	66,87	138,06 _{ab}	60,13
	Primavera	110,65 ^a _a	45,63	78,84 ^b _a	46,46	84,93 ^b _a	63,09
	Verano	70,63 _b	75,03	78,56 _b	67,63	71,03 _a	75,04
	Otoño	104,85 _c	49,96	100,71 _{ab}	40,54	114,71 _b	71,63

^{a, b, c}: Diferentes superíndices para valores medios de una misma fila indican diferencias significativas a un nivel de $p < 0,05$

^{a, b, c, d}: Diferentes subíndices para valores medios de una misma columna indican diferencias significativas a un nivel de $p < 0,05$, para cada variable enzimática.

En el presente trabajo, los valores más elevados de AST corresponden a las hembras que se encuentran a principio y mitad de la lactancia (meses de primavera y verano). Estos niveles más elevados para la enzima AST coinciden con los mínimos de colesterol y podrían indicar alteraciones hepáticas (Marcos, 1980).

La mayoría de los niveles de actividad de ALT encontrados en este estudio están dentro del rango considerado normal por Meyer y Harvey (2000), quien obtiene valores comprendidos entre 17 y 37 U/l.

Los cambios de actividad en las transaminasas se relacionan con el estado fisiológico del animal, así en vacas algunos autores (Saba y col., 1987; Kuleta, y col., 1993) informan un incremento en los niveles de la actividad de esta enzima luego del parto. Saba y col., (1987) indican que los niveles superiores de AST y ALT observados

en vacas luego del parto se relacionan con el aumento del metabolismo necesario para la producción de leche, mientras que en vacas con acidosis y alcalosis, el aumento postnatal de los niveles de transaminasas se considera como el resultado del daño ocasionado en el parénquima de los órganos. Sin embargo, Lechowski (1993) observa que los cambios en la actividad de ALT no permiten determinar el carácter, magnitud y reversibilidad de los cambios hepáticos. El aumento de la actividad de estas enzimas también acompaña a ciertos desórdenes de metabolismo de tipo energético (Jonkisz, 1999).

Los valores determinados para la actividad de ALP concuerdan con el rango de 29-99 U/l (Meyer y Harvey 2000) y resultaron ser inferiores a los observados por Coppo y col. (2001) quién reportó actividades comprendidas entre 116 y 161 U/l.

Kwiatkowski y col. (1993) observaron un aumento de la actividad ALP en vacas luego del parto, sin embargo hay otros investigadores que informan una actividad alta de esta enzima durante el período seco. Saba y Bis-Wencel (1992) consideran que la actividad de ALP creciente es el resultado de desórdenes en el metabolismo del Ca y P. Incrementos en la actividad de ALP también ocurre en vacas con acidosis (Lechowski, 1993; Nicpon y Jonkisz 1997) y alcalosis (Nicpon y Jonkisz 1997) como resultado de una lesión hepática.

Se ha encontrado muy poca información acerca de la actividad enzimática de la amilasa sérica en bovinos. Entre los diversos autores consultados, Meyer y Harvey (2000) señalan niveles comprendidos entre 22 y 137 U/l, concordantes con los obtenidos en la presente investigación.

Puesto que los resultados del ANOVA-MR para las concentraciones de AST señalan diferencias significativas en HALO, categoría y estación, los análisis en series temporales se aplicaron en forma individual a las medias correspondientes a cada grupo de 6 animales en cada estación del año (12 ajustes cosenoidales) De este modo se estimaron los parámetros que representan los cambios rítmicos de la actividad de AST en sangre.

En Tabla 36 se puede observar los componentes característicos del ritmo diario de AST: mesor, amplitud, frecuencia y acrofase, como también el coeficiente de correlación (R). Se evidencia claramente que los datos registrados se ajustaron con gran exactitud a los valores estimados por el modelo de regresión no lineal a partir de la ecuación observada en dicha Tabla. La representación gráfica de los valores de la actividad media enzimática y los valores ajustados mediante el modelo se pueden visualizar en la Figura 25.

Tabla 36. Modelos rítmicos diarios determinados mediante un ajuste no lineal de una función coseno que representan las variaciones temporales de los niveles séricos de AST de bovinos Holstein

		$AST = A_0 + A_1 * \text{Cos} (w * t + \Phi)$									
Estación	Categoría	A_0		A_1		W		Φ		R	
		X	ES	X	ES	X	ES	X	ES		
Invierno	Vaquillona	57,642	2,976	12,450	2,701	0,037	0,008	22:52	02:28	0,93	
	Vaca	44,323	1,954	7,590	2,457	0,037	0,010	20:44	03:26	0,85	
	Toro	104,734	2,615	29,933	3,580	0,043	0,003	20:09	00:85	0,97	
Primavera	Vaquillona	83,313	0,573	8,053	0,566	0,034	0,003	22:08	00:88	0,99	
	Vaca	72,552	1,298	6,958	1,578	0,039	0,007	21:01	01:99	0,91	
	Toro	109,485	6,223	18,646	5,083	0,036	0,010	01:35	03:07	0,93	
Verano	Vaquillona	58,988	0,978	9,545	1,196	0,050	0,004	04:09	01:04	0,95	
	Vaca	70,501	2,304	16,746	5,086	0,052	0,011	02:37	02:80	0,97	
	Toro	76,74	5,085	12,756	4,477	0,044	0,016	00:10	04:30	0,98	
Otoño	Vaquillona	58,194	2,178	9,906	1,664	0,041	0,008	00:58	02:62	0,97	
	Vaca	59,322	3,668	9,217	3,069	0,042	0,015	23:09	04:08	0,91	
	Toro	75,146	0,795	10,582	0,779	0,041	0,003	22:24	00:73	0,99	

A_0 ; A_1 =mmol/l; $w=1/h$; $t=h$; $\Phi=h$

X: Media muestral, ES: Error Standard, R: coeficiente de correlación del modelo.

Los períodos (T) calculados a partir de los valores de frecuencia (W) obtenidos de la Tabla 36 indican que las oscilaciones registradas en las actividades de AST a lo largo del día se ajustan a ritmos diarios, con ciclos que presentan una duración comprendida entre las 19:23 h y 29:46 h.

Se debe destacar que no se han encontrado en la bibliografía consultada valores relativos a las variaciones diarias de la actividad de esta enzima en sangre de bovinos, ni en otras especies, por ello no se pudo establecer una comparación y discusión de estos parámetros.

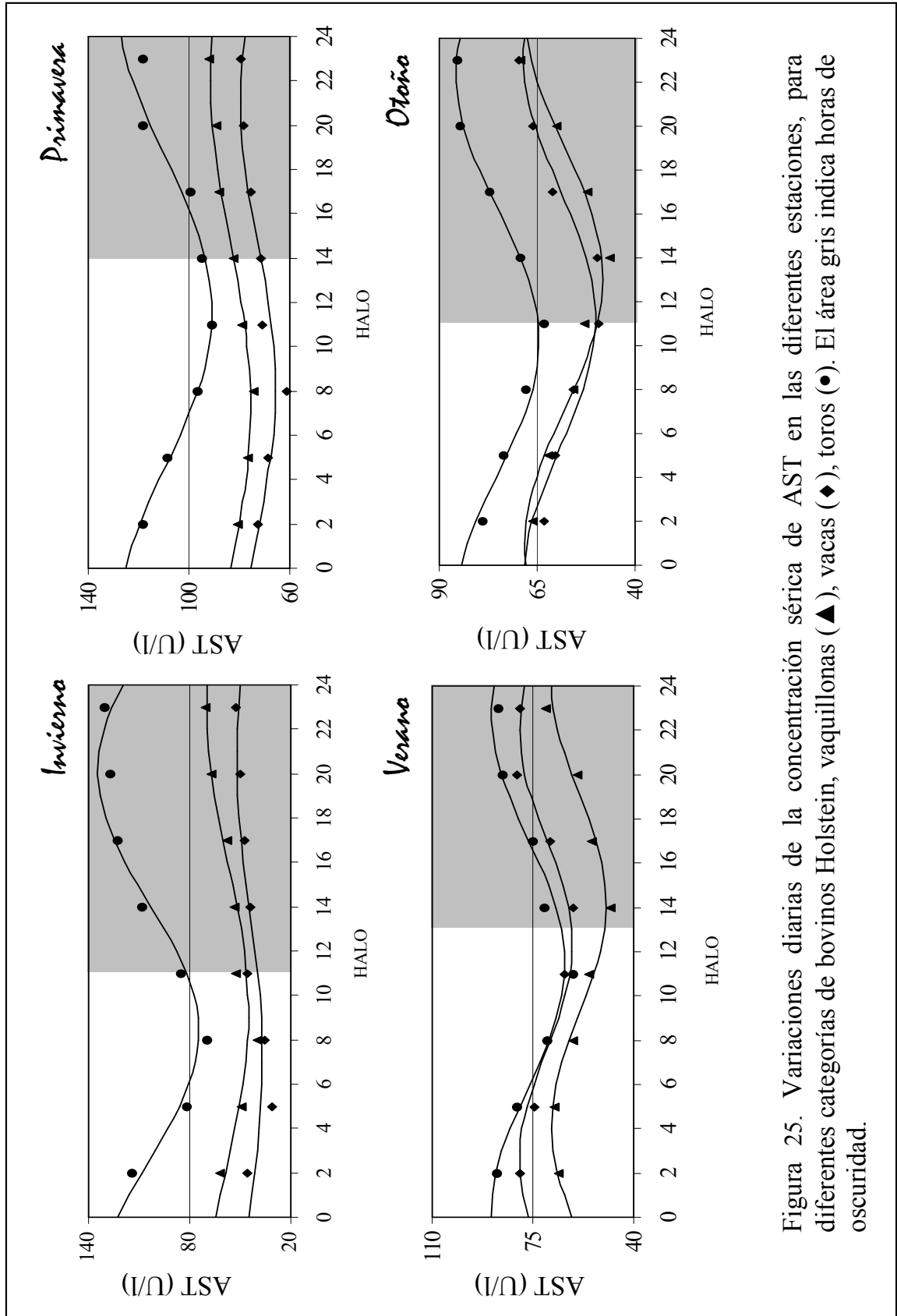


Figura 25. Variaciones diarias de la concentración sérica de AST en las diferentes estaciones, para diferentes categorías de bovinos Holstein, vaquillonas (▲), vacas (◆), toros (●). El área gris indica horas de oscuridad.

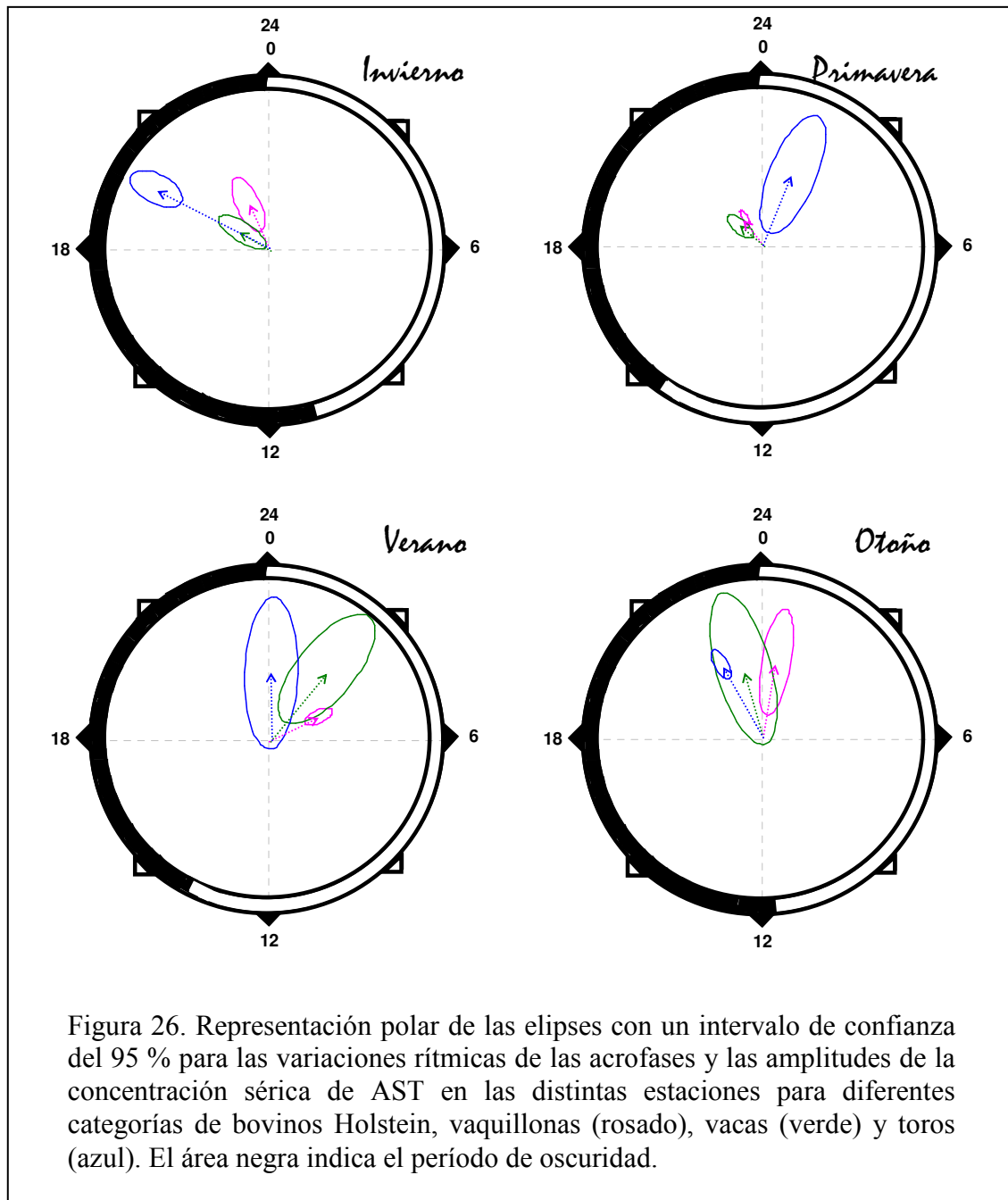
Tabla 37. Valores medios de los periodos de los ritmos de AST en sangre de bovinos Holstein

Categoría	Invierno	Primavera	Verano	Otoño
Vaquillona	27:11	29:46	20:04	24:20
Vaca	27:18	25:44	19:23	23:53
Toro	23:31	28:01	22:31	24:20

En el presente trabajo, los ritmos de la actividad de AST registrados en las diferentes estaciones del año y en los tres grupos de bovinos, presentan sus acrofases entre las últimas horas de la noche y las primeras horas del día. El valor medio del mesor y la variación de la amplitud fue mayor en toros que en hembras en las cuatro estaciones del año.

Con el propósito de visualizar las posibles discrepancias o coincidencias en las formas de las curvas cosenoidales (acrofases y amplitudes), se construyó la Figura 26 donde se representa en coordenadas polares ambos parámetros para cada categoría en las cuatro estaciones. También se muestran las elipses que corresponden a un intervalo de confianza del 95 % ($p < 0,05$) ajuste.

Las elipses correspondientes al grupo toros en el verano y a las vacas en el otoño incorporan al origen de coordenadas polares, hecho que no permite afirmar que existan ritmos diarios con una confianza del 95 %. Durante el invierno, las acrofases de los tres grupos se presentaron en las horas de oscuridad. En primavera las hembras presentaron su acrofase en las horas de oscuridad y el grupo macho en las de luz. En verano, el momento de máxima concentración se produjo en el periodo fótico para las tres categorías, mientras que en el otoño, tuvo lugar prácticamente al comienzo de la salida del sol.



Con respecto a la segunda enzima analizada, los valores de la actividad de ALT presentaron efecto significativo en HALO, categoría y estación, al igual que la enzima anterior. Por tal motivo se procedió a aplicar ajuste cosenoidal a los valores medios de actividad de ALT en cada una de las categorías y en las diferentes estaciones del año considerados en el modelo estadístico. Los resultados se exponen en la Tabla 38.

Tabla 38. Modelos rítmicos diarios determinados mediante un ajuste no lineal de una función coseno que representan las variaciones temporales de los niveles de ALT séricos de bovinos Holstein

		$ALT = A_0 + A_1 * \text{Cos} (w * t + \Phi)$									
Estación	Categoría	A_0		A_1		W		Φ		R	
		X	ES	X	ES	X	ES	X	ES		
Invierno	Vaquillona	25,799	0,359	2,053	0,477	0,041	0,006	04:38	02:27	0,91	
	Vaca	24,596	0,610	3,426	0,753	0,044	0,006	04:01	02:08	0,92	
	Toro	27,003	0,838	4,539	1,248	0,046	0,005	06:23	01:72	0,98	
Primavera	Vaquillona	30,138	0,879	3,509	1,096	0,041	0,008	08:41	02:48	0,85	
	Vaca	24,919	0,752	4,347	0,717	0,029	0,008	04:47	03:45	0,95	
	Toro	43,366	0,931	4,877	1,288	0,041	0,006	07:44	02:01	0,89	
Verano	Vaquillona	23,802	0,770	7,953	0,874	0,042	0,003	03:32	01:23	0,96	
	Vaca	25,071	0,912	7,598	1,303	0,048	0,003	05:41	01:09	0,91	
	Toro	27,629	0,784	6,439	6,984	0,044	0,004	04:14	01:39	0,96	
Otoño	Vaquillona	16,297	0,390	3,979	0,489	0,042	0,003	04:12	01:23	0,97	
	Vaca	15,349	0,552	5,227	0,779	0,046	0,003	05:21	01:06	0,96	
	Toro	26,287	0,550	5,113	0,821	0,044	0,003	07:17	01:03	0,95	

A_0 ; A_1 =mmol/l; $w=1/h$; $t=h$; $\Phi=h$

X: Media muestral, ES: Error Standard, R: coeficiente de correlación del modelo.

Al igual que en los casos anteriores, a partir de los parámetros rítmicos (Tabla 38) se construyó la Figura 25 donde se aprecia las variaciones diarias de los valores medios de actividad de ALT cuantificados en función de HALO, así como también las curvas ajustadas mediante el modelo cosenoidal. Resulta evidente que los datos experimentales se ajustaron adecuadamente a los valores estimados a partir de dicho modelo, puesto que los coeficientes de correlación resultaron en todos los casos superiores a 0,85 (Tabla 38).

A fin de verificar los posibles ritmos diarios de las actividades de ALT, se calcularon los valores de los períodos (T, Tabla 39) a partir de sus correspondientes valores de frecuencia (W, Tabla 38). Los resultados muestran que las oscilaciones de la variable en estudio a lo largo del día, en las diferentes estaciones y categorías, tienen una duración cercana a las 24 h, poniendo en evidencia la existencia de ritmos diarios para la actividad de esta enzima.

Tabla 39. Valores medios de los períodos de los ritmos de ALT en sangre de bovinos Holstein

Categoría	Invierno	Primavera	Verano	Otoño
Vaquillona	24:38	24:26	23:53	23:58
Vaca	22:40	34:53	20:52	21:49
Toro	21:49	24:32	22:31	22:45

En el presente trabajo, los perfiles que expresan la variación diaria de la actividad de ALT en vaquillonas, vacas, y toros en cada estación resultaron similares (Figura 27). En efecto, durante las primeras horas de la tarde se presenta la máxima actividad enzimática, seguida de una disminución progresiva durante la noche. En las cuatro estaciones del año se observa que el valor medio del mesor fue mayor en el grupo de los toros que en las hembras. Con respecto a las amplitudes, se presentaron una acentuada variabilidad entre las distintas categorías, especialmente en las estaciones de verano y otoño.

Con el propósito de representar las amplitudes y acrofases para cada estación, se construyó la Figura 28 en coordenadas polares, donde se aprecia que todas las elipses no incluyen al origen de coordenadas, denotando la existencia de ritmos diarios con una certeza del 95 %. La presentación de las acrofases se encuentra en la misma área del ciclo de luz. A excepción del grupo toros en el verano, las acrofases de las demás categorías en las cuatro estaciones presentaron poca variabilidad.

Respecto a las diferencias estadísticas en los comportamientos rítmicos, se puede observar en esta Figura que en invierno el grupo de machos difiere de los dos grupos de hembras, mientras que en primavera la diferencia se presenta en el grupo de vacas con respecto a los restantes y en el verano entre vaquillonas y vacas pero estas no mostraron diferencias con el grupo toro debido a su gran dispersión. Por último, no se observaron diferencias significativas en el comportamiento de los ritmos de las tres categorías en el otoño.

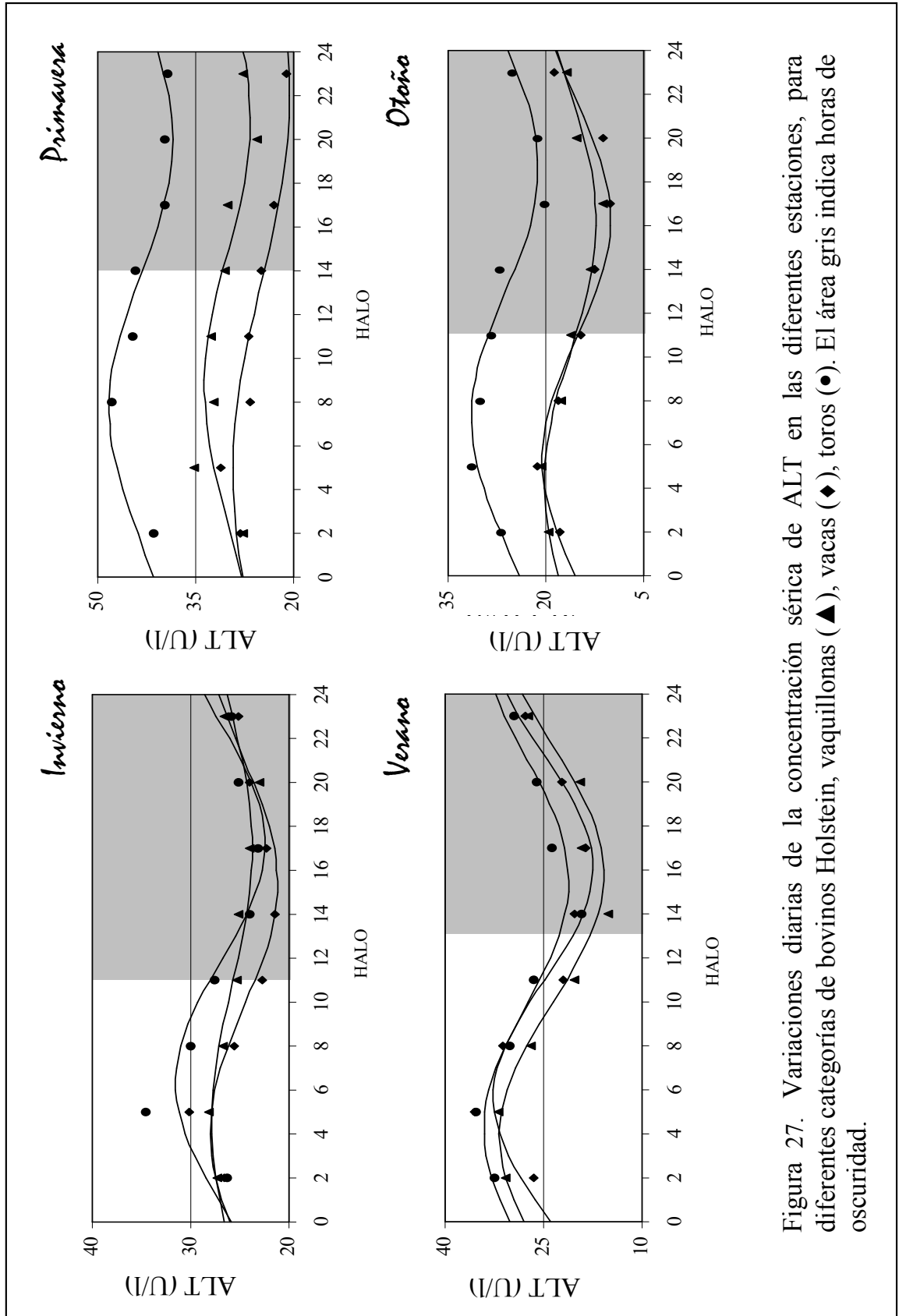
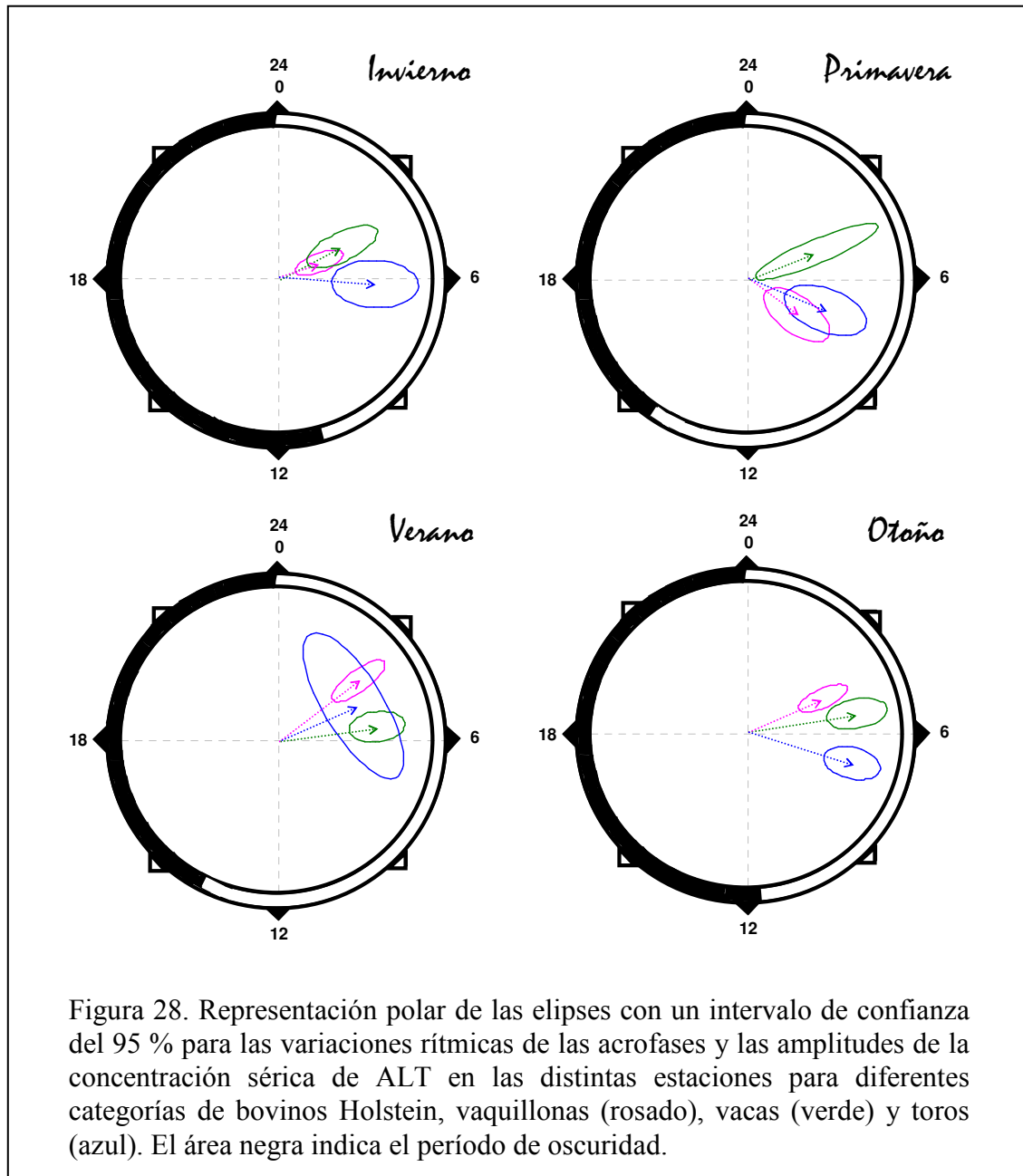


Figura 27. Variaciones diarias de la concentración sérica de ALT en las diferentes estaciones, para diferentes categorías de bovinos Holstein, vaquillonas (▲), vacas (◆), toros (●). El área gris indica horas de oscuridad.



La tercera enzima analizada en este estudio fue ALP. Debido a que los valores medios no se vieron afectados por el efecto estación en cada una de las categorías (Tabla 34), las modelizaciones mediante funciones cosenoidales se realizaron a los grupos de 24 individuos (pudiendo considerar cada una de las estaciones como una réplica del experimento) para cada categoría de bovinos (3 ajustes en términos de coseno).

En Tabla 40 se muestran los principales parámetros rítmicos obtenidos tras el ajuste cosenoidal, así como los coeficientes de correlación determinados entre las sumas de cuadrados ajustados por el modelo y la suma de cuadrados totales. Como se aprecia en la mencionada Tabla, los coeficientes de correlación fueron elevados, indicando un adecuado ajuste mediante el modelo no lineal. La representación gráfica de los valores medios de la actividad de ALP junto a las curvas cosenoidales pueden observarse en la Figura 29.

De la misma forma que en los casos anteriores, haciendo uso de los datos de frecuencia (Tabla 31) se calcularon los valores período (T). Se puede considerar que las variaciones en la actividad de ALP se ajustan a un ritmo diario, con períodos de 22:07 h para las vaquillonas; 22:11 h para las vacas y 24:55 h para los toros, comprendidos todos ellos dentro del rango 16:00 – 32:00 h considerado por Reinberg y Halberg (1971).

Tabla 40. Modelos rítmicos diarios determinados mediante un ajuste no lineal de una función coseno que representan las variaciones temporales de los niveles séricos de ALP de bovinos Holstein

Categoría	ALP = A ₀ + A ₁ * Cos (w * t + Φ)								
	A ₀		A ₁		W		Φ		R
	X	ES	X	ES	X	ES	X	ES	
Vaquillona	60,530	0,196	2,378	0,245	0,045	0,003	15:14	00:93	0,98
Vaca	56,218	0,381	2,287	0,528	0,045	0,005	16:14	01:75	0,91
Toro	61,727	1,074	2,383	1,061	0,040	0,016	15:10	06:01	0,75

A₀; A₁=mmol/l; w=1/h; t=h; Φ=h

X: Media muestral, ES: Error Standard, R: coeficiente de correlación del modelo.

Además, el análisis de Figura 29 pone de manifiesto que las máximas concentraciones se presentaron a las 15:14; 16:14 y 15:10 HALO para el grupo de vaquillona, vaca y toro, respectivamente. El mesor y la amplitud fueron similares en todas las categorías. Debido a la similitud de la expresión de las acrofases se puede establecer que el sincronizador preponderante es el fotoperíodo, siendo la salida del sol el determinante de su presentación.

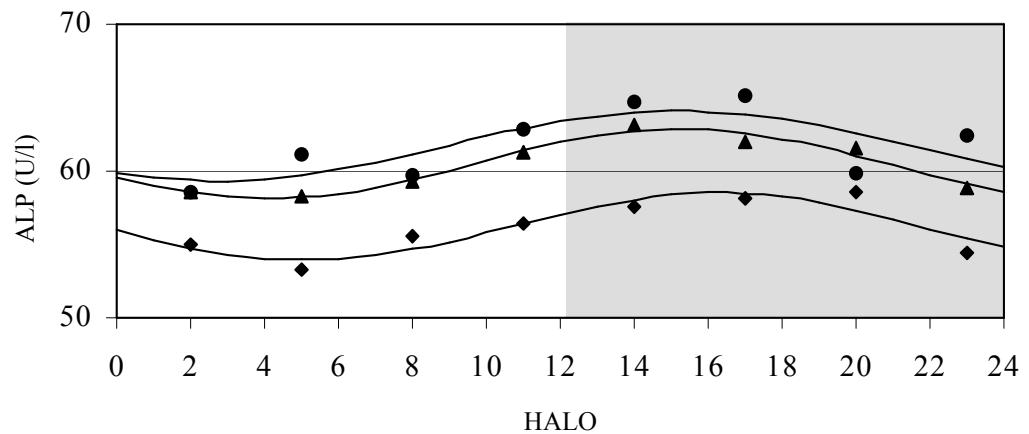


Figura 29. Variaciones diarias de la concentración sérica de ALP para diferentes categorías de bovinos Holstein, vaquillonas (▲), vacas (◆), toros (●). El área gris indica horas de oscuridad.

La gráfica en coordenadas polares (Figura 30) permite establecer que los grupos de las hembras (vacas y vaquillonas) presentaron un comportamiento rítmico en lo que respecta a la actividad de la enzima ALP, mientras que el grupo de los toros manifestó una mayor variabilidad en sus niveles puesto de manifiesto por el mayor tamaño de la elipse, que a diferencia de los casos anteriores, incluye al origen de coordenadas.

En lo que respecta a la hora del día en la que se presentan las acrofases de las tres categorías, se debe aclarar que las mismas tienen lugar durante el ciclo de oscuridad. Por otra parte, debido a la superposición de las elipses, no se puede afirmar que existan diferencias significativas entre los tres grupos con un 95 % de confianza.

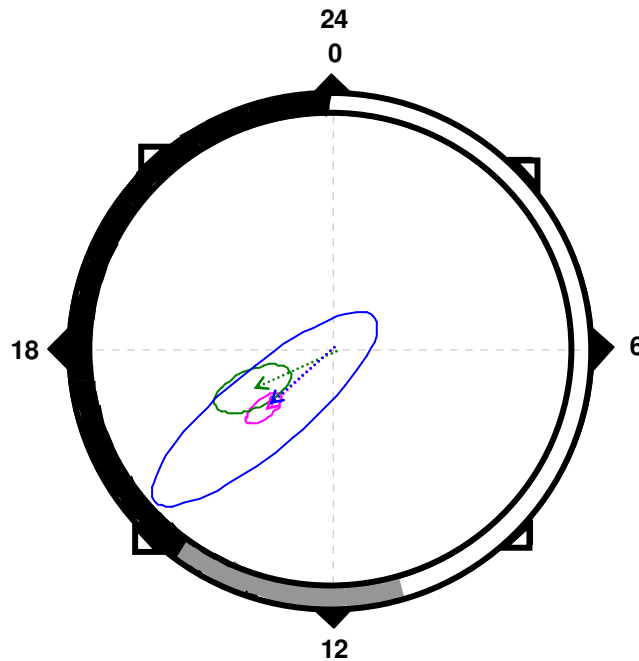


Figura 30. Representación polar de las elipses con un intervalo de confianza del 95 % para las variaciones rítmicas de las acrofases y las amplitudes de la concentración sérica de ALP en las distintas estaciones invierno (azul), primavera (verde), verano (rojo) y otoño (marrón) en bovinos Holstein. El área negra indica el período de oscuridad, el área gris marca la zona de transición del periodo luz-oscuridad entre las estaciones.

Con respecto a la cuarta enzima analizada en este trabajo, la amilasa, debido a que los valores de la actividad no presentaron efecto significativo en las tres categorías evaluadas, se agruparon los datos de los animales de los grupos de vaquillonas, vacas y toros ($n = 18$). Por tal motivo, el análisis de series temporales se aplicó para cada estación de año. Los componentes rítmicos calculados mediante un ajuste no lineal de una función coseno para las variaciones diarias de la actividad enzimática, se resumen en Tabla 41. La representación gráfica de las actividades medias junto a las curvas cosenoidales ajustadas se pueden observar en Figura 31.

Los valores de los coeficientes de correlación (R) obtenidos fueron adecuados, al encontrarse comprendidos entre 0,75 (invierno) y 0,92 (otoño).

Tabla 41. Modelos rítmicos diarios determinados mediante un ajuste no lineal de una función coseno que representan las variaciones temporales de los niveles de amilasa sérica de bovinos Holstein

Estación	Amilasa = $A_0 + A_1 * \text{Cos} (w * t + \Phi)$								
	A_0		A_1		W		Φ		R
	X	ES	X	ES	X	ES	X	ES	
Invierno	126,743	10,005	50,540	14,926	0,050	0,005	17:58	01:54	0,75
Primavera	86,995	5,628	43,197	7,994	0,054	0,004	00:09	01:06	0,88
Verano	73,488	4,688	38,203	6,961	0,043	0,004	07:02	01:25	0,89
Otoño	104,690	5,083	50,799	7,363	0,046	0,003	19:25	00:87	0,92

A_0 ; A_1 =mmol/l; $w=1/h$; $t=h$; $\Phi=h$

X: Media muestral, ES: Error Standard, R: coeficiente de correlación del modelo.

En este estudio se han observado ritmos diarios en las cuatro estaciones, con frecuencia cercana a 0.279 rad h^{-1} . El mesor y la amplitud fueron mayores en invierno y otoño.

Los valores medios de los períodos (T) de los ritmos de la actividad amilasa en invierno (19:52 h), primavera (18:35 h), verano (23:21 h) y otoño (21:31 h) se dedujeron a partir de los valores de frecuencia (W) indicados en Tabla 41. Se pone de manifiesto que la amilasa presenta ritmicidad diaria, con un período de alrededor de 24 h (Reinberg y Halberg, 1971).

En Tabla 41 y en las gráficas que constituyen la Figura 31 se puede apreciar que los valores del mesor y amplitud fueron menores en primavera y verano. Se observa además la gran similitud que existe entre las curvas rítmicas obtenidas en invierno, primavera y otoño, donde se visualiza que sus acrofases se expresan durante las horas de oscuridad. En cambio, en los meses del verano, la acrofase se presenta durante las horas de luz.

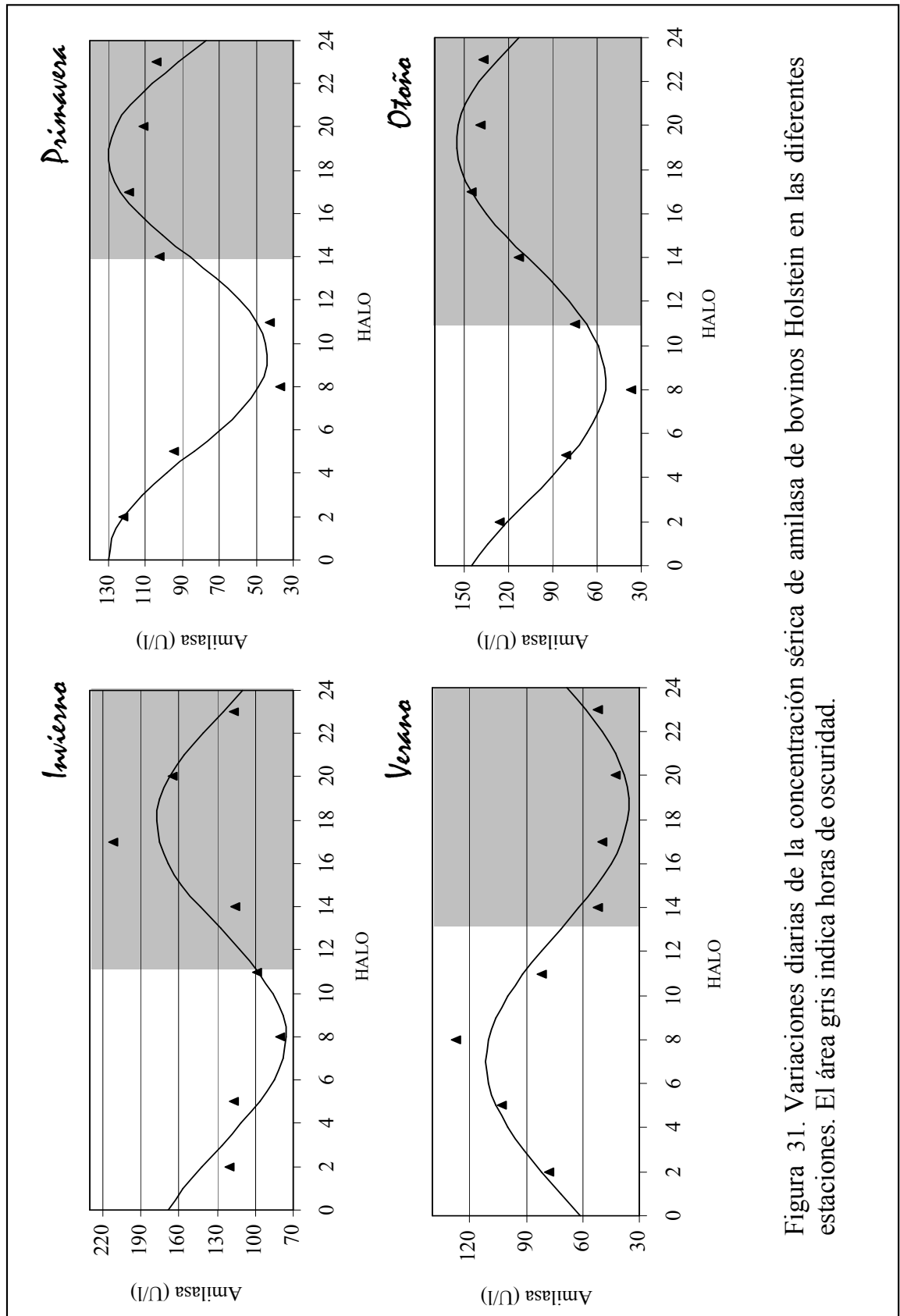


Figura 31. Variaciones diarias de la concentración sérica de amilasa de bovinos Holstein en las diferentes estaciones. El área gris indica horas de oscuridad.

La representación en coordenadas polares de los valores de las acrofases y amplitudes (Figura 32) muestran que las elipses correspondientes a las cuatro estaciones no incluyen al origen de coordenadas, poniendo de manifiesto la existencia de ritmos diarios con una seguridad del 95 %. Las acrofases se presentan en invierno y otoño en el área del ciclo de oscuridad, mientras que en verano y en primavera se producen en el período de luz. Exceptuando invierno y otoño, estos parámetros rítmicos presentaron diferencias estadísticas entre las estaciones verano, primavera e invierno-otoño.

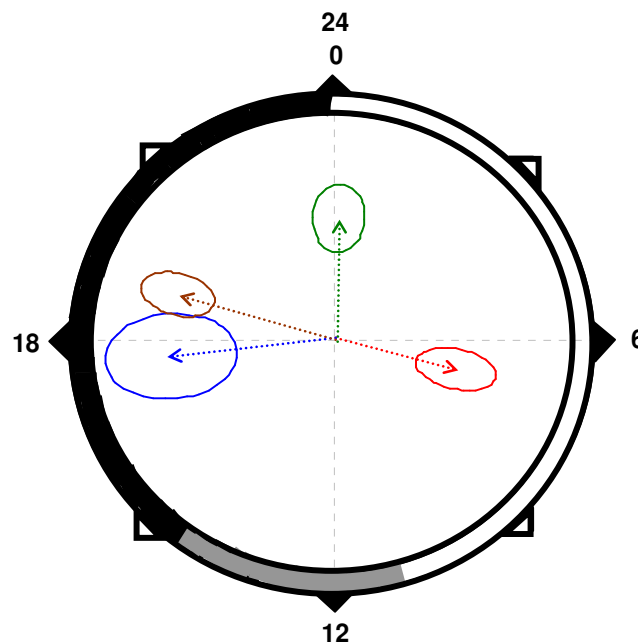


Figura 32. Representación polar de las elipses con un intervalo de confianza del 95 % para las variaciones rítmicas de las acrofases y las amplitudes de la concentración sérica de amilasa en las distintas estaciones invierno (azul), primavera (verde), verano (rojo) y otoño (marrón) en bovinos Holstein. El área negra indica el período de oscuridad, el área gris marca la zona de transición del período luz-oscuridad entre las estaciones.

IV.6. TEMPERATURA CORPORAL

La ritmicidad de la temperatura corporal ha sido extensamente estudiada en humanos y animales de laboratorio (Aschoff, 1981b; Refinetti y Menaker, 1992) pero mucho menos en animales de granja (Piccione y Refinetti, 2003c). La ritmicidad de la temperatura corporal es un marcador fiable de la operatividad del reloj biológico (Zulley y col., 1981; Klerman y col., 2002) y un indicador de la salud general y del metabolismo energético del animal (Cossins y Bowler, 1987; Blumberg, 2002).

En bovinos manejados en sistema extensivo, se registró una temperatura corporal media de $38,33\text{ °C} \pm 0,83$. Estos valores coincidieron con los encontrados por Piccione y col., 2003b; sin embargo resultaron aproximadamente $0,5\text{ °C}$ inferiores a los observados por otros autores (Hahn y col., 1990; Chesy y col., 1983; Lefcourt y col., 1999; Araki y col., 1987; Chesy y col., 1985).

Los resultados del análisis de varianza con muestras repetidas para la temperatura rectal, indican que los efectos estación del año y HALO afectaron en forma significativa ($p < 0,05$), mientras que el factor categoría no mostró efecto significativo.

En la Tabla 42 se representan los valores medios y desviaciones típicas de la temperatura corporal en diferentes categorías de bovinos y estaciones del año, así como también las diferencias estadísticas encontradas.

En dicha Tabla se aprecia que la temperatura corporal presentó diferencias significativas ($p < 0,05$) entre sexos en primavera y verano. En esas estaciones del año, las hembras, se encontraban a principios y a mitad de la lactancia, respectivamente. Por otra parte, coincidió, con las temperaturas ambientales mas elevadas del muestreo (primavera: temperatura mínima $22,6\text{ °C}$, temperatura máxima $30,8\text{ °C}$ y 69% promedio de humedad y verano: temperatura mínima $10,8\text{ °C}$, temperatura máxima $21,1\text{ °C}$ y 76% promedio de humedad), que en la primavera. Durante el invierno y otoño las vaquillonas y vacas no se encontraban en producción y la temperatura no presentó diferencias significativas.

Tabla 42. Principales parámetros estadísticos de la temperatura rectal para diferentes categorías de bovinos y estaciones del año

Variable física	Estación	Vaquillonas		Vacas		Toros	
		X	DS	X	DS	X	DS
Temperatura Rectal (°C)	Invierno	38,43 ^a	0,50	38,54 ^a	0,42	38,54 ^a	0,45
	Primavera	39,31 ^{a_b}	1,150	39,53 ^{a_b}	1,26	38,66 ^{b_a}	1,18
	Verano	38,08 ^{a_c}	0,66	37,95 ^{a_c}	0,73	38,34 ^{b_a}	0,44
	Otoño	37,81 ^c	0,80	37,52 ^c	0,93	37,79 ^b	0,69

^{a, b, c}: Diferentes superíndices para valores medios de una misma fila indican diferencias significativas a un nivel de $p < 0,05$

^{a, b, c, d}: Diferentes subíndices para valores medios de una misma columna indican diferencias significativas a un nivel de $p < 0,05$

Además se puede observar que el número de lactancias (vaquillonas y vacas) no afecta la temperatura corporal en ninguna de las cuatro estaciones. Las vaquillonas y vacas presentaron diferencias significativas para las distintas fases de la lactancia ($p < 0,05$), observándose la mayor temperatura en la primer fase de lactancia (primavera) y disminuyendo hacia el final. El aumento de la temperatura corporal en el período improductivo podría deberse a la gestación avanzada. Las temperaturas observadas reflejan la actividad metabólica durante las curvas productivas y gestacionales.

Nuestros resultados coinciden con los encontrados por Araki y col. (1983), quienes observaron que la temperatura vaginal en vacas en lactación es superior a las de las vacas secas.

En los toros la temperatura rectal fue significativamente menor ($p < 0,05$) en otoño que durante el resto del año. Durante el muestreo de otoño se registró la temperatura ambiental mas baja del año (temperatura mínima 9,2 °C, temperatura máxima 1,6 °C y 95 % promedio de humedad).

El análisis de la varianza señala que existieron cambios cronobiológicos (efecto HALO) significativos ($p < 0,05$) y no hubo diferencias significativas entre grupos. Por este motivo para caracterizar y cuantificar el ritmo diario de la temperatura corporal por medio del análisis de series temporales, el ajuste coseinodal se aplicó a los datos correspondientes a los 18 animales en cada una de las cuatro estaciones.

En la Tabla 43 se indican los parámetros rítmicos determinados mediante un ajuste no lineal de una función coseno a los datos de temperatura corporal, clasificados según las estaciones.

A partir de dichos parámetros se construyó la Figura 31 donde se visualizan las medias de la temperatura corporal determinados en este trabajo en función de HALO, así como también las curvas ajustadas mediante el modelo cosenoidal, para las cuatro estaciones. Los elevados valores de los coeficientes de correlación (R, Tabla 43) ponen de manifiesto el adecuado ajuste alcanzado mediante el modelo de regresión no lineal, al resultar en todos los casos superior a 0,90.

Tabla 43. Modelos rítmicos diarios determinados mediante un ajuste no lineal de una función coseno que representan las variaciones temporales de la temperatura rectal de bovinos Holstein

Estación	Temperatura rectal = $A_0 + A_1 * \text{Cos} (w * t + \Phi)$								R
	A_0		A_1		W		Φ		
	X	ES	X	ES	X	ES	X	ES	
Invierno	38,513	0,032	0,274	0,047	0,046	0,003	08:22	01:04	0,90
Primavera	39,249	0,102	1,229	0,132	0,046	0,003	09:43	00:77	0,96
Verano	38,043	0,055	0,549	0,046	0,035	0,003	09:41	00:90	0,98
Otoño	37,739	0,067	0,640	0,092	0,046	0,003	09:02	00:94	0,93

A_0 ; A_1 =mmol/l; $w=1/h$; $t=h$; $\Phi=h$

X: Media muestral, ES: Error Standard, R: coeficiente de correlación del modelo

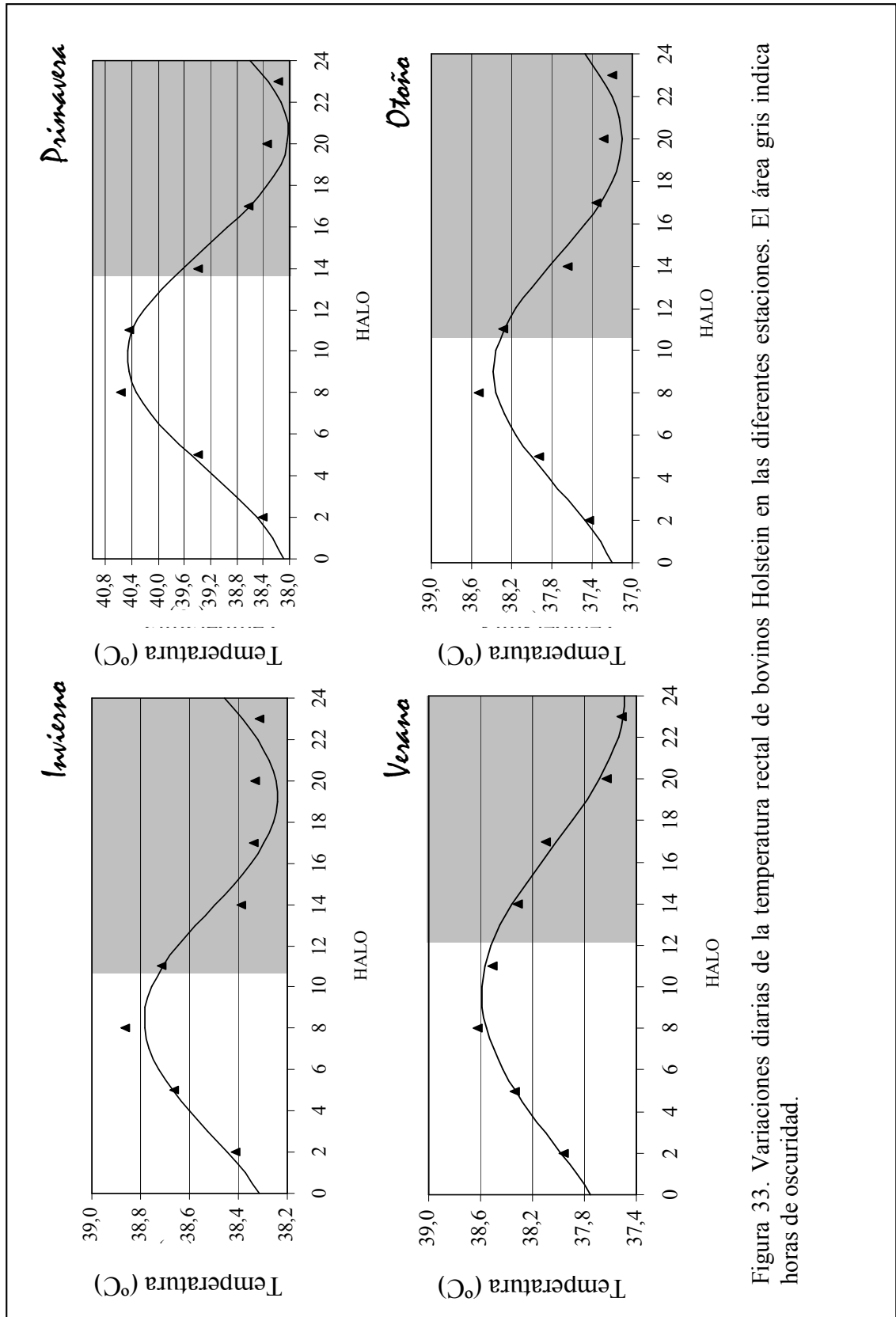


Figura 33. Variaciones diarias de la temperatura rectal de bovinos Holstein en las diferentes estaciones. El área gris indica horas de oscuridad.

Los valores de los períodos (T) se calcularon teniendo en cuenta las frecuencias de la Tabla 43. Se puede considerar que las variaciones en la temperatura corporal se ajustan a un ritmo diario, con períodos de 21:53 h (invierno); 21:44 h (primavera); 28:33 h (verano) y 21:58 h (otoño), comprendidos en el rango 16:00 – 32:00 h.

Del análisis de la Tabla 43 y la Figura 31 se pone en evidencia que los valores del mesor y amplitud fueron mayores en la primavera, y las acrofases para las cuatro estaciones fueron similares. En primavera, otoño, invierno y verano, la acrofase se observa aproximadamente 1 hora antes de la puesta del sol (Invierno: 8:22 HALO; Primavera: 9:43 HALO; Verano: 9:41 HALO y Otoño: 9:02 HALO) (Figura 31), lo cual es coincidente con los resultados de estudios previos (Hahn y col., 1990).

En la representación polar (Figura 32) se puede observar la acrofase y la amplitud estimadas mediante el método no lineal de una función coseno junto con la elipse de confianza para un 95% para la variable temperatura rectal para las cuatro estaciones del año. En ella se aprecia la gran homogeneidad entre las estaciones en cuanto a la manifestación de la acrofase. Al no incluir ninguna el centro podemos afirmar con un 95 % de confianza que presentan ritmos diarios. Entre verano y otoño no se observan diferencias estadísticas, pero si entre estas estaciones con invierno y primavera.

El ritmo diario de la temperatura corporal es afectado por las variaciones en la actividad física y metabólica de los animales homeotermos y se sincroniza con las modificaciones diarias de la intensidad lumínica.

El estudio de la ritmicidad de la temperatura corporal en los animales de granja es importante desde una perspectiva comparativa y económica, debido a que un mayor conocimiento de esta no solamente proveerá una mayor comprensión de los procesos cronobiológicos en mamíferos sino también generará conocimientos esenciales para el mejoramiento y la optimización de la industria lechera y cárnica en medicina veterinaria.

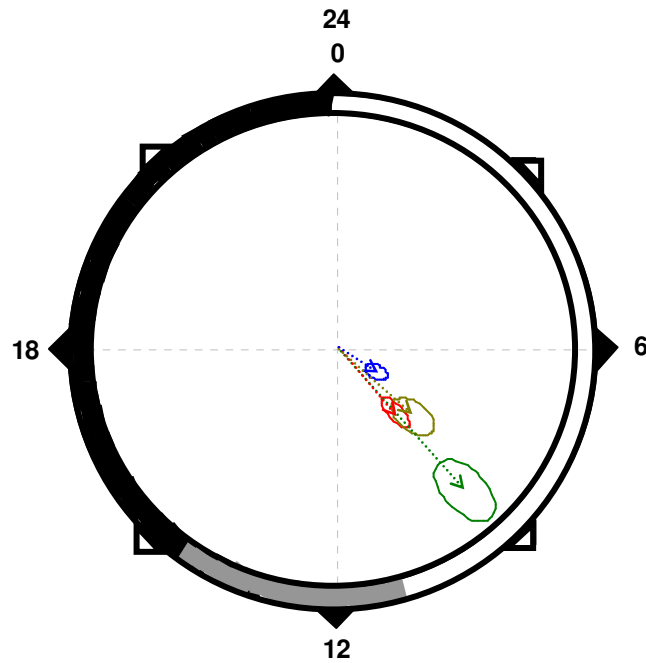


Figura 34. Representación polar de las elipses con un intervalo de confianza del 95 % para las variaciones rítmicas de las acrofases y las amplitudes de la temperatura rectal en las distintas estaciones invierno (azul), primavera (verde), verano (rojo) y otoño (marrón) de bovinos Holstein. El área negra indica el período de oscuridad, el área gris marca la zona de transición del periodo luz-oscuridad entre las estaciones.

IV.7. ASOCIACIÓN DEL COMPORTAMIENTO RÍTMICO DE LAS VARIABLES SANGUÍNEAS MEDIANTE ANÁLISIS CLUSTER

En la Figura 45 se muestran los resultados por categoría de la aplicación del Análisis Cluster a las variables sanguíneas que presentaron ritmicidad diaria.

Se puede observar la constitución de cuatro grandes cluster para las tres categorías. El primero de ellos, está constituido por “Glóbulos Rojos-Hemoglobina-Hematocrito”, ya que la distancia de Ward’s para las tres categorías resultó inferior a $d_w = 123$ (categoría vaquillonas). Esta similitud en el comportamiento temporal de estos tres componentes ya se había observado en la Figura 6 (elipses) del apartado IV.1. En efecto, dichos componentes presentaron una acrofase en las horas diurnas comprendidas entre 02:23 HALO (toros durante el otoño) y 09:14 (vacas en primavera), según Tabla 14.

Esta similitud en el comportamiento de estas tres variables eritrocitos (células $\times 10^{12}/l$), hematocrito (%) y el contenido de hemoglobina (g/l) se debe al paralelismo que existen en sus variaciones. Las complejas relaciones entre los parámetros hematológicos y las condiciones ambientales suponen por parte de los primeros cierta dependencia de la concentración de CO_2 , niveles de actividad, sexo, concentración de oxígeno, estado fisiológico y actividad eritropoyética medular regulada por el fotoperíodo.

El segundo cluster está formado por las variables “Creatinina-Magnesio” ($d_w = 210$ para vaquillonas y $d_w = 239$ para vacas). El magnesio presentó sus acrofases en la segunda mitad de la fase fótica y comienzo de la oscuridad (desde la 06:42 HALO para vaquillonas en primavera y 14:11 HALO para vacas en otoño) según se muestra en Tabla 14, similar al comportamiento de creatinina, que mostró sus acrofases a finales de la fase de luz (10:17 HALO para vaquillonas en primavera y 11:32 HALO para toros en otoño, Tabla 32).

La asociación entre el magnesio y la creatinina podría deberse a que ambos participan en el metabolismo energético. El magnesio a través de la activación del ATP

y en la transferencia de fosfatos de alta energía y la fosfocreatina como depósito celular de energía y amortiguador de la concentración de ATP (Guyton, 1991).

Este análisis multivariante forma otro cluster constituido por las enzimas “ALT-AST-Glucosa”. La glucosa se integra al finalizar el cluster con una distancia que resulta mixta en el grupo toro ($dw = 1845$). Las enzimas presentan su acrofase dentro de un período de tiempo que corresponde al final de la zona de oscuridad y primer mitad de la fase de luz, para AST (desde 20:44 HALO para vacas en invierno hasta 04:09 HALO para vaquillonas en verano, Tabla 36) y para ALT (03:32 HALO para vaquillonas en verano y 08:21 HALO para vaquillonas en primavera, Tabla 38).

La glucosa es el principal sustrato energético del cerebro, feto, glándula mamaria y músculo. En el rumiante, la neoglucogénesis es de fundamental importancia ya que las cantidades de este azúcar absorbidas a nivel intestinal son muy bajas. La neoglucogénesis es permanente y se produce casi íntegramente en el hígado (Ndibuallonji y Godeau, 1993). El cluster formado por la glucosa y las transaminasas podría deberse a que estas enzimas intervienen en la vía metabólica (ciclo de Cahill), cuyo producto final es la glucosa siendo los precursores aminoácidos provenientes de la alimentación y metabolismo. La neoglucogénesis proveniente de aminoácidos constituye entre un 7 % y 20 % de ésta vía metabólica (Swenson y Reece, 1999).

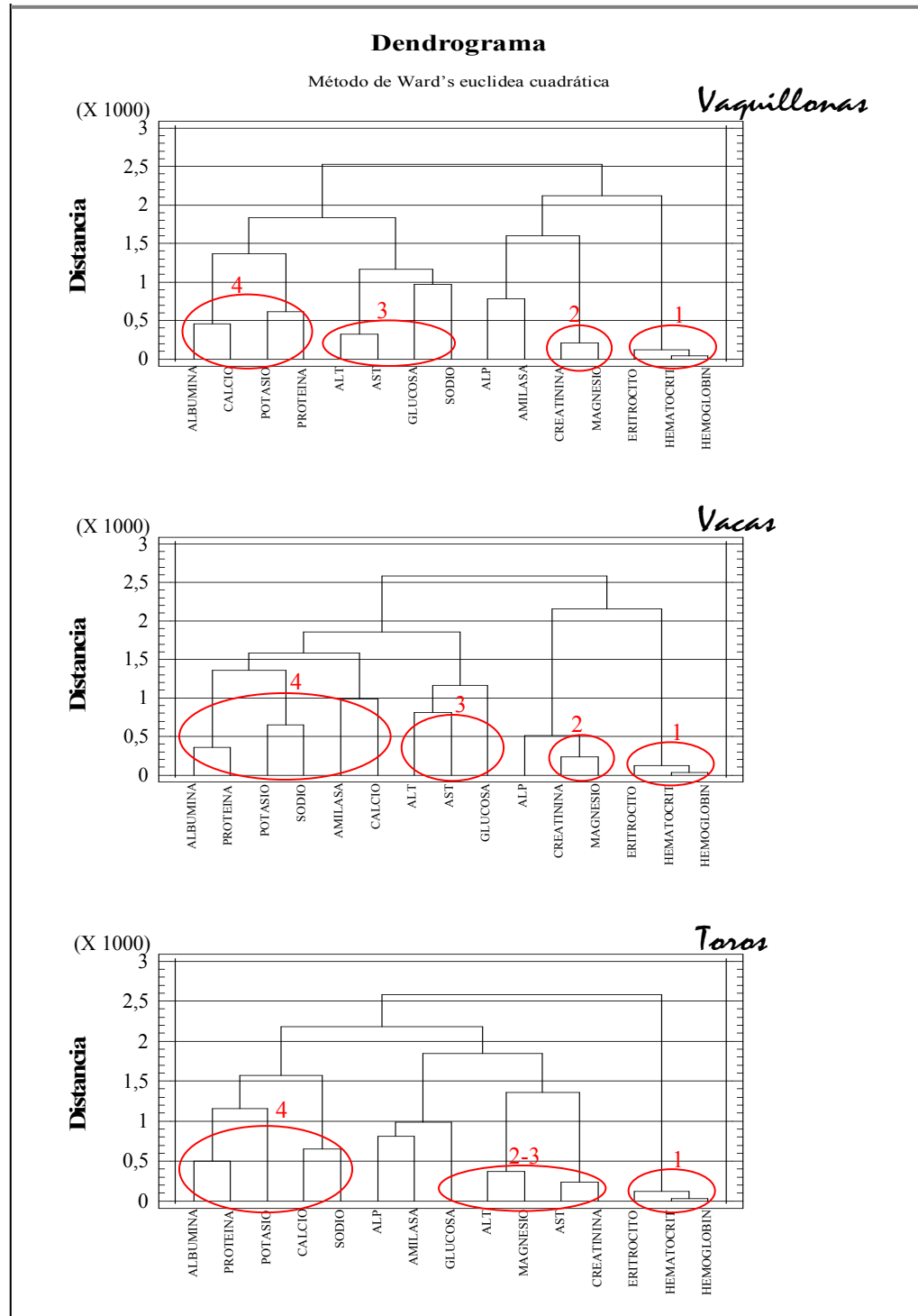


Figura 35. Asociaciones de los componentes sanguíneos que manifestaron ritmos diarios en las diferentes categorías bovinas (vaquillonas, vacas y toros). Con círculos rojos se presentan los diferentes cluster.

La asociación entre el cluster 2 (Creatinina-Magnesio) y 3 (ALT-AST-Glucosa) observada en el grupo toro se puede atribuir probablemente a que estos animales se encuentran solamente con gasto energético de mantenimiento y por lo tanto la neoglucogénesis hepática es suficiente para proveer al organismo de suficiente cantidad de glucosa, y así sintetizar el ATP que se utilizará como fuente de energía para las funciones celulares. A la vez, el ATP se encuentra en equilibrio reversible con el fosfato de creatina que constituye el principal depósito de energía en la célula (Guyton, 1991). Durante las horas que tiene lugar la acrofase de la creatina libre (final de la fase fótica, Figura 24) se corresponde con los mínimos niveles de glucosa. Este hecho se puede atribuir a la disociación de la creatina-P en momentos que disminuye los niveles de glucosa, acompañado de un incremento en la concentración de creatinina libre. Por el contrario, cuando se produce un incremento en la fuente de energía, los niveles de glucosa se encuentran aumentadas (final de la fase oscuridad y comienzo de la fase de luz, preferentemente, Figura 18), acompañado de un exceso de ATP, que produciría un desplazamiento del equilibrio a favor de la formación de creatina-P; y por consiguiente una disminución en los niveles de creatinina libre (Figura 23). La diferencia en la constitución de los cluster en la categoría de hembras (vaquillonas y vacas) respecto a los toros se puede atribuir a que las hembras estarían con déficit energético provocado por la alta producción y/o gestación. En estos períodos cuando se necesitan mayores cantidades de energía, se utiliza la reserva de fosfato de creatina y además la relación insulina/glucagón disminuye, la utilización periférica de la glucosa se hace mínima en los tejidos y órganos no involucrados en la producción, y la neoglucogénesis hepática es máxima a partir de precursores distintos del propionato (aminoácidos, lactato y glicerol) (Ndibuallonji y Godeau, 1993). Esto explicaría que en estas categorías los Cluster 2 y 3 se encuentren separados.

El cuarto cluster corresponde a los componentes sanguíneos “Proteínas Totales-Albúminas-Calcio-Potasio-Sodio”. Esta asociación podría explicarse por el hecho de que la albúmina es el principal contribuyente de las proteínas totales plasmáticas y una de sus múltiples funciones es el transporte de una amplia variedad de sustancias como el calcio (50 % fijado a proteínas plasmáticas) y la hormona esteroide aldosterona (60 % fijado a albúmina) responsable de la regulación de los niveles de sodio y potasio.

V - CONCLUSIONES

A partir del trabajo realizado y a la luz de los resultados obtenidos, se llegó a las siguientes conclusiones:

Los efectos cronobiológicos se evidencian en el bovino en numerosas variables fisiológicas. Se encontraron variaciones cronobiológicas que se ajustan a ritmos diarios en los niveles de eritrocitos, hemoglobina, hematocrito, calcio, magnesio, sodio, potasio, glucosa, proteínas totales, albúminas, creatinina, AST, ALT, ALP, amilasa y temperatura corporal.

Las variables leucocitos, linfocitos, monocitos, granulocitos, plaquetas, fósforo, colesterol, triglicéridos, bilirrubina total y urea, que no presentaron ritmo diario, podrían manifestarlo con otra periodicidad, en rara ocasión no poseerlo o no expresarlo por una gran variabilidad de los datos, un reducido número de individuos utilizados en el experimento, al modelo estadístico ó ruidos ajenos que nada tienen que ver con la presencia de variaciones cíclicas como enmascaradores o errores analíticos.

Con respecto al factor categoría, se evidenciaron diferencias significativas en las medias de los niveles de eritrocitos, hemoglobina, hematocrito, magnesio, proteínas totales, albúminas, creatinina, AST, ALT y ALP, manifestándose en términos generales una similitud en sus comportamientos rítmicos.

El factor estación del año afectó en forma significativa a las medias de los valores de eritrocitos, hemoglobina, hematocrito, calcio, magnesio, sodio, proteínas, albúmina, creatinina, AST, ALT, amilasa y temperatura rectal. Pese a las diferencias de la duración del ciclo luz-oscuridad de cada estación, dichas variables presentaron en general sus acrofases a similares HALO, poniendo en relieve la importancia de la luz como sincronizador de estos ritmos.

La aplicación del análisis Cluster a las variables sanguíneas que presentaron ritmicidad diaria, reveló la presencia de asociaciones en las tres categorías, con la formación de cuatro aglomerados constituidos por “eritrocito-hematocrito-

hemoglobina”, “creatinina-magnesio”, “ALT-AST- glucosa” y “albúmina-proteína-potasio-calcio-sodio”. Estas asociaciones se pueden atribuir a sincronizaciones rítmicas entre órganos, tejidos y células.

De todo ello se desprende que resulta necesario establecer protocolos de trabajos que consideren la época del año y las horas de muestreo cada vez que se evalúen variables sanguíneas en bovinos lecheros de crianza extensiva.

La caracterización de los ritmos diarios presento amplitudes dentro de los rangos fisiológicos que no interfieren en el diagnóstico de laboratorio. Sin embargo, la ritmicidad de algunas variables puede tener importancia fisiológica y, en algunos casos, implicaciones en farmacología experimental y clínica.

El conocimiento de la estructura temporal periódica del bovino facilita una mejor comprensión funcional de su organismo, resulta de gran utilidad en el manejo y diagnóstico preventivo y permite detectar las repercusiones que los cambios ambientales pueden tener sobre la organización temporal funcional. Por ello, cualquier tratamiento ha de tener presente la variabilidad temporal de los procesos fisiológicos para lograr el mejor efecto terapéutico, minimizando las acciones colaterales y particularmente los perjudiciales.

El presente estudio cronobiológico representa un aporte para entender los fenómenos orgánicos desde un punto de vista más amplio, la adaptación de organismos a temporizaciones impuestas por el ambiente. A partir de ello resulta necesario profundizar mediante otras investigaciones que esclarezcan las bases anatómicas y fisiológicas de la ritmicidad circadiana en el bovino “la fisiología del sistema circadiano” y los factores externos que afectan a la manifestación de los ritmos “la sincronización ambiental”.

CAPÍTULO VI. RESUMEN

La organización temporal del metabolismo de los animales es fundamental para la producción y se ve influenciada por numerosas funciones y estados fisiológicos, que están sincronizadas con condiciones ambientales. El objetivo del presente trabajo fue analizar, las variaciones cronobiológicas de variables sanguíneas y temperatura corporal, valorar los efectos categoría y época del año sobre los ritmos, y determinar asociaciones entre las variables, en bovinos sometidos a un sistema de alimentación pastoril, sujetos a la variación natural del ciclo luz-oscuridad, en el hemisferio sur. El trabajo se llevó a cabo durante los años 2002 y 2003. Se utilizaron 18 bovinos Holstein. Los animales se dividieron en 3 grupos experimentales de seis animales cada uno, según las siguientes categorías: vaquillonas, vacas y toros. En cada estación (invierno, primavera, verano y otoño), a cada animal durante un período de 24 h y a intervalos de 3 h, se registró la temperatura rectal y se obtuvo por punción yugular una muestra de sangre de 30 ml. Las extracciones se realizaron respetando el HALO (hours after light onset) en cada estación. En todas las muestras se realizaron las siguientes determinaciones: glóbulos rojos, concentración de hemoglobina, hematocrito, glóbulos blancos, linfocitos, macrófagos, granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), plaquetas, calcio, fósforo inorgánico, magnesio, sodio, potasio, glucosa, colesterol, triglicéridos y bilirrubina total, proteínas totales, albúminas, urea, creatinina, aspartato aminotransferasa, alaninoamino transferasa, fosfatasa alcalina, y amilasa. Se utilizó el análisis de la varianza para muestras repetidas. El modelo estadístico fue el siguiente: $Y_{ijk} = \mu + [H]_i + [EA]_l + [C]_j + \epsilon_{ijk}$. La existencia de la forma periódica y su caracterización se realizó con la metodología de Gauss-Newton para obtener el primer término de la serie de Fourier $y_i = A_0 + A_1 * \text{Cos}(w * t + \Phi)$. Para establecer asociaciones entre las variables, se ha empleado el análisis cluster. En los niveles de eritrocitos, hemoglobina, hematocrito, calcio, magnesio, sodio, potasio, glucosa, proteínas totales, albúminas, creatinina, AST, ALT, ALP, amilasa y temperatura corporal se observaron ritmos diarios, mientras que el resto de las variables restantes no presentaron variaciones diarias. Con respecto al factor categoría, se evidenciaron diferencias significativas en las medias de los niveles de eritrocitos, hemoglobina, hematocrito, magnesio, proteínas totales, albúminas, creatinina, AST, ALT y ALP, manifestándose en términos generales una similitud en sus comportamientos rítmicos.

El factor estación del año afectó en forma significativa a las medias de los valores de eritrocitos, hemoglobina, hematocrito, calcio, magnesio, sodio, proteínas, albúmina, creatinina, AST, ALT, amilasa y temperatura rectal. La aplicación del análisis Cluster a las variables sanguíneas que presentaron ritmicidad diaria, reveló la presencia de asociaciones en las tres categorías, con la formación de cuatro aglomerados constituidos por “eritrocito-hematocrito-hemoglobina”, “creatinina-magnesio”, “ALT-AST-glucosa” y “albúmina-proteína- potasio-calcio-sodio”. Los resultados aquí presentados evidencian que la mayoría de las variables sanguíneas, manifiestan ritmos biológicos que se ajustan a ciclos diarios, sincronizados principalmente por el fotoperíodo. El conocimiento de la estructura temporal periódica del bovino facilita mejor comprensión funcional de su organismo, resulta de gran utilidad en el manejo y diagnóstico preventivo y permite detectar las repercusiones que los cambios ambientales pueden tener sobre la organización temporal funcional. Por tal motivo resulta necesario considerar la época del año y las horas de muestreo dentro del protocolo de trabajo

SUMMARY

The temporary organization of the metabolism of the animals is fundamental for the production and it is influenced by numerous functions and physiologic states that are synchronized with environmental conditions. The objective of the present work was to analyze, the chronobiology variations of haematological variables and body temperature, to value the effects category and time of the year on the rhythms, and to determine associations among the variables, in dairy cattle in a grazing system, subject to the natural variation of the cycle light-darkness, in the south hemisphere. The work was carried out during the years 2002 and 2003. Eighteen bovine Holstein were used. The animals were divided in three experimental groups of six animals each one, according to the following categories: heifers, cows and bulls. In each station (winter, spring, summer and autumn), the rectal temperature was registered and blood samples by jugular puncture was obtained in each animal during a period of 24 h at intervals of 3 hours. The extractions were carried out respecting the HALO (hours after light onset) in each station. The following determinations were carried out in all the samples: erythrocytes, hemoglobin concentration, hematocrit, leukocytes, lymphocytes, macrophages, granulocytes (neutrophils, eosinophils and basophils), platelets, calcium, inorganic phosphorus, magnesium, sodium, potassium, glucose, cholesterol, triglycerides and total bilirubina, total proteins, albumins, urea, creatinine, AST, ALT, ALP, and amilase. The analysis of the variance was used by repeated samples. The statistical pattern was the following: $Y_{ijk} = \mu + [H]_i + [EA]_I + [C]_j + \epsilon_{ijk}$. The existence in the periodic way and their characterization was carried out with Gauss-Newton methodology to obtain the first term of the series of Fourier $y_i = A_0 + A_1 * \cos(w * t + \Phi)$. To establish associations among the variables, the analysis cluster has been used. In the levels of erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, calcium, magnesium, sodium, potassium, glucose, total proteins, albumins, creatinine, AST, ALT, ALP, amilase and body temperature daily rhythms were observed, while the rest of the remaining variables didn't present daily variations. With regards to the factor category, significant differences were evidenced in the mean of the levels of erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, magnesium, total proteins, albumins, creatinine, AST, ALT and ALP, showing in general terms a similarity in their rhythmic behaviors. The factor station of the year affected significantly to the mean of the levels of erythrocytes, hemoglobin,

hematocrit, calcium, magnesium, sodium, proteins, albumin, creatinine, AST, ALT, amilase and rectal temperature. The application of the analysis Cluster to the haematological variables that presented daily rhythmicity, it revealed the presence of associations in the three categories, with the formation of four agglomerates constituted by “erythrocyte-hematocrit-hemoglobin”, “creatinine-magnesium”, “ALT-AST-glucose” and “albumin-protein - potassium-calcium-sodium.” The results presented here evidence that most of the haematological variables manifest biological rhythms that are adjusted to daily cycles, synchronized mainly by the photoperiod. The knowledge of the periodic temporary structure of the bovine facilitates a better functional understanding of its organism, it is of great use in the handling and diagnostic preventive and it allows detecting the repercussions that the environmental changes can have on the functional temporary organization. For such a reason it is necessary to consider the time of the year and the hours of sampling inside the protocol working.

CAPÍTULO VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Acosta, G.B.; Otero–Losada, M.E. y Rubio, M.C. (1990). Chronic chemical stress. *Acta Physiol. Pharm.* 40: 267–268.
2. Aguilar-Roblero, R. (1993). Teorías básicas de los ritmos biológicos. *Psiquis*, 2: 121-132.
3. Althaus, R.L.; Tardivo, P.A.; Perren, L.C.; Flores, A. (1991). Perfiles metabólicos en vacas lecheras holando Argentino. Parte I: Variación durante el período de lactancia. *Revista de Medicina Veterinaria*. 72 (3): 100-109.
4. Althaus, R.L.; Flores, A.; Scaglione, M.C. y Perren, L.C. (1992). Perfiles metabólicos en vacas lecheras Holando Argentino. Parte II: Variación durante el período de secado. *Revista de Medicina Veterinaria*, 73 (5): 240-247.
5. Amélia, A. y Silva, B. (1997). Aspectos metodológicos de la cronobiología. En: *Cronobiología. Principios y aplicaciones*. Ed. Universidad de Buenos Aires, Argentina. pp. 236-261.
6. Araki, C.T.; Nakamura, R.M.; Kam, L.W.G. y Clarke, N. (1984). Effect of lactation on diurnal temperature patterns of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 67: 1752-1760.
7. Araki, C.T.; Nakamura, R.M. y Kam, L.W.G. (1987). Diurnal temperature sensitivity of dairy cattle in a naturally cycling environment. *J Therm Biol* 12: 23-26.
8. Arendt, J. (1995). *Melatonin and the mammalian pineal gland*. London. Chapman and Hall.
9. Aschoff, J. (1960). Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cols Spring Harbo Symp. Quant. Biol.*, 25: 11-28.
10. Aschoff, J. (1981a). Annual rhythms in man. En: *Handbook of behavioral Neurobiology-Biological rhythms*, vol .4. J. Aschoff (ed.) New York, Plenum Press, pp. 475-487.
11. Aschoff, J. (1981b). Thermal conductance in mammals and birds: its dependence on body size and circadian phase. *Comp. Biochem. Physiol.* 69A: 611-619.
12. Ayo, J.O.; Oladele, S.B.; Ngam, S.; Fayomi, A.; y Afolayan, S.B. (1999). Diurnal fluctuations in rectal temperature of the Red Sokot goat during the harmattan season. *Res. Vet. Sci. Feb*, 66: 7-9.

13. Baghdassarian, R.A.; Aghadadian, S.N.; Hairapetian, T.V.; Yeghian, V.A.; Burshtein, G.Y. y Filian, J.P. (1990). Comparative study of sodium, potassium, ionized calcium, urea and creatinina circadian rhythm documented in samples of capillary and venous blood healthy subjects. *Chronobiologia*. 17: 15-25.
14. Bajksy, C.A.; Reiczigel, J. y Szenci, O. (1999). Cicardian changes in blood ionized calcium, sodium, potassium, and chloride concentrations and pH in cattle. (1999). *Am. J. Vet. Res.* 60: 945-953.
15. Balcells, A. (1978). *La Clínica y el Laboratorio*, Ed. Marín, Barcelona, p. 606.
16. Barrer, M.A. y Grindem BC. (2000). Interpretación del hemograma. *Selecc. Vet.* 8: 500–510.
17. Barton, B.A.; Jorgensen, N.A. y De Lucca, H.F. (1987). Impact of prepartum dietary phosphorus intake on calcium homeostasis at parturition. *J Dairy Sci* 70: 1188-1191.
18. Bertouch, J.V.; Roberts-Thompson, P. y Bradley, J. (1983). Diurnal variation of lymphocyte subsets identified by monoclonal antibodies. *Br. Med. J.* 186: 1171-1172.
19. Best, C.H. y Taylor, N.B. (1986). *Bases Fisiológicas de la Práctica Médica*, 11° ed., Panamericana, Buenos Aires, p. 1572.
20. Bickerstaffe, R.; Annison, E.F. y Linzell, J.L. (1974). The metabolism of glucose, acetate, lipids and aminoacids in lactating dairy cows. *J Agric. Sci. Camb.* 82: 71-85.
21. Bingham, C., Cornelissen, G., halberg, E. y Halberg, F. (1984). Testing period for single cosinor: extent of human 24 h cardiovascular synchronization on ordinary routine. *Chronoioogia* 11: 263-274.
22. Bitman, J.; Lefcourt, A.; Wood, D.L. y Stroud, B. (1984). Circadian and ultradian temperatura rhythms of lactating dairy cows. *J. Dairy Scai.* 67: 1014-1023.
23. Bitman, J.; Wood, D.L y Lefcourt, A.M. (1989). Rhythms in cholesterol, cholesteryl esters, free fatty acids, and triglycerides in blood of lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 73.948-955.
24. Bligh, J. y Harthoorn, A.M. (1965). Continuous radiotelemetric records of the deep body temperature of some unrestrained African mammals under near-natural conditions. *J Physiol Lond* 176: 145-162.

25. Blum, J.W.; Kunz, P. y Leuenberger, H. (1983). Thyroid hormones, blood plasma metabolites and haematological parameters in relationship to milk yield in dairy cows. *Anim Prod* 36:93-104.
26. Blumberg, M.S. (2002). *Body Heat*. Cambridge, MA, Harvard University Press.
27. Boggio J.C. (1993). Estudio cronofarmacocinético del acetato de ciproterona en el conejo. Editorial Universidad Complutense de Madrid. ISBN 84-8466-418x. Madrid. Pp 204.
28. Breur, H.; Kaulhausen, H; Mühlbauer, W.; Fritzsche, G. y Vetter, H. (1974). Circadian rhythm of the renin-angiotensin-aldosterone system. In: *Chronobiological aspects of endocrinology*, edited by J. Aschoff; Ceresa, F. And Halberg F. Schattauer Verlag, F.K. new York, pp 268-279.
29. Bruguerolle, B.; Levi, F.; Arnaud, C.; Bouvenot, G.; Mechkouri, M.; Vannetzel, J.M. y Touitou, Y. (1986). Alteration of physiologic circadian time structure of six plasma proteins in patients with advanced cancer. *Ann. Rev. Chronopharmacol.* 3: 207-210.
30. Bush, B.M (1982). *Manual del Laboratorio Veterinario de Análisis Clínicos*, editorial ACRIBIA. Zaragoza, España, pp 467.
31. Butler, W.R.; Calaman, J.J. y Beam, S.W. (1996). Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lacting dairy cattle. *J. Anim. Sci.*, 74: 858-865.
32. Caola, G.; Assenza, A..M.; Fazio, E., y Piccione, G. (1991). Andamento ultradiano di alcuni parametri ematochimiciniella Pecora e nella Capra *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Messina*, 28: 51-63.
33. Caola, G.; Fazio, E.; Piccione, G. y Rabiad, A. (1992). Variazioni giornaliere di metaboliti ematici nella Pecoracomisana al pascolo. *Atti Congr. Int. S.I.P.A.O.C.* 10: 212-214.
34. Caola, G.; Fazio, E.; Giofré, F.; Panzera, M. y Piccione, G. (1993). Andamento annuale di alcuni metabolitematici nel Vitello in accrescimento. *Atti Soc. It.Buiatria.* 25: 549-554.
35. Capen, C.C.y Rosol, T.J. (1989). Calcium-regulating hormones and diseases of abnormal mineral metabolism”, in Kaneko J.J. (ed.) *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, Academic Press, Inc, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto; 678-752.

36. Cardinali, D.P. (1981). Hormone effects on the pineal gland. En: *The pineal gland- Anatomy and biochemistry*, vol. I R.J. Reiter (ed). Boca Raton, FA, CRC press, pp.243-272.
37. Cardoniga, R. (1990). Cronofarmacocinética. Implicaciones terapéuticas. *Anales Real Academia de Medicina Tomo CVII:185-214*.
38. Carroll, D.J.; Barton, B.A.; Anderson, G.W. y Smith, R.D. (1988). Influence of protein intake and feeding strategy on reproductive performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 71: 3470-3481.
39. Chesy, G; Caputa, M.; Kadziela, W.; Kozak, W. y Lachowski, A. (1983). The influence of ambient temperature on brain homeothermia in the ox (*Bos taurus*). *J Therm Biol* 8: 259-263.
40. Chesy, G.; Caputa, M.; Kadziela, W.; Kozak, W. y Lachowski, A. (1985). Selective brain cooling in the ox (*Bos taurus*) during heavy exercise. *J Therm Biol* 10: 57-61.
41. Christie, W.W. (1981). The composition, structure and function of lipids in the tissues of ruminant animals. En: *Lipid metabolism in ruminant animals*. W.W. Christie, ed. Pergamon Press, New York, NY. p 95
42. Chudoba-Drozdoeska, B. (1984). Seasonal fluctuations of total protein and its fractions content in blood plasma of the ncb bred cows. *Zesz. Nauk. A.R. we Wroclawiu, Zoot.* 26: 25-134.
43. Cirio, A. y Tebot, I. (2000). *Fisiología Metabólica de los Rumiantes*, Ed. CSIC, Montevideo, pp 43-53.
44. Claypool, D.W. (1976). Factors affecting calcium, phosphorus and magnesium status of dairy cattle on the Oregon coast. *J. Dairy Sci.*, 59: 2005-2007.
45. Clement, C.; Jans, F. y Blue, J. (1991). Hormones and metabolites in lactating dairy cows fed insufficient amounts of protein. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 65: 244.
46. Coles, E.H. (1989). *Veterinary Clinical Pathology*, 4th ed., Saunders, Philadelphia, p. 10–42.
47. Contreras, P. (2000). Indicadores do metabolismo proteico utilizados nos perfis metabolicos de rebanhos. In: *Perfil Metabolico em Rumiantes: seu Uso em Nutrição e Doenças Nutricionais* (Gonzales FH, Barcello JO, Patiño HO, Ribeiro LA Ed.), Grafica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

48. Coppo, J.A.; Scorza, S.H. y Coppo, N.B. (1994). Biochemical profiles of argentine cattle supplemented with cotton seed. *RIA* 25: 91–102.
49. Coppo, J.A.; Coppo, N.B.; Slanac, A.L. (1996). Ontogenia del medio interno en terneros lactantes cruza cebú. *Actas Ciencia & Técnica UNNE* 2: 99–101.
50. Coppo, J.A. (2001). *Fisiología Comparada del Medio Interno*, Ed. Dunken, Buenos Aires, p. 212–217; 289–290.
51. Corbellini, C.N. (1983). La bioquímica sanguínea aplicada al diagnóstico en bovinos lecheros. *Prod. Anim. (Bs Aires)* 10:43-53
52. Cornélissen, G.; Halberg, F.; Stebbings, F.; Halberg, E.; Carandente, F. y Bartholome, H. (1980). Chronobiometry with pocket calculators and computer systems. *La Ricerca Clin. Lab.* 10:333-385.
53. Cossins, A.R. y Bowler, K. (1987). *Temperature Biology of Animals*. London, Chapman & Hall., pp 339.
54. Costas, E.J.; Martínez, P. y López, R. (1989). Cronocarcinología. Poniendo en hora los relojes biológicos: los peculiares casos de los espermatozoides y las artemias. Ed. Fundación Científica de la Asociación Española contra el cáncer. Madrid. pp 224.
55. Cugini, P.; Lucia, P.; Murano, G.; Di Palma, L.; Battisti, P. y Cogliati A. (1988) Cronobiología per la medicina: principi e metodologia. *Agg. Med.* 12: 1988: 675-685.
56. Czeisler, C. (1978). Human circadian physiology: Internal organization of temperature, sleep-wake, and neuroendocrine rhythms monitored in an environment free of time cues. California, Stanford University, tesis de doctorado.
57. Czeisler, C.; Weitzman, E.D.; Moore-Ede, M.C.; Zimmerman, J.C. y Knauer, R.S. (1980). Human sleep: its duration and organization depend on its circadian phase. *Science*, 210: 1264-1267.
58. Daan, S. y Pittendrigh, C.S. (1976). A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. I. The stability and lability of spontaneous frequency. *J. Comp. Physiol.* 106A: 223-253.
59. DaSilva, R.G. y Minomo F.R. (1995). Circadian and seasonal variation of the body temperature of sheep in a tropical environment. *Int. J. Biometeorol.* 39: 69-73.

60. Dauth, J.; Dreyer, M.J. y Coning, J.P. (1984). Ionized calcium versus total calcium in dairy cows. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 55: 71-72.
61. Davidson, T.L. y Fewell J.E. (1993). Ontogeny of a circadian rhythm in body temperature in newborn lambs reared independently of material time cues. *J. Dev. Physiol.* 19: 51-56.
62. De Luca, L.J. (1988). Fisiología de la reproducción. C.E.V. – UBA, Bs Aires.
63. Deputa, W. y Dorynek, Z. (1993). Formation of hematological parameters in dairy cows. *Roczn. AR w Poznaniu.* 136, 1993, 15-21. Hematological parameters in dairy cows]. *Roczn. ARW Poznaniu.* 136: 15-21.
64. Díez- Noguera. (1998). Cronobiología. En: Mora Maciá J, Gonzalez Juanatey JR. Cronoterapia de la hipertensión. Ergon, Madrid, pp 5-20.
65. Díez-Noguera, A. (2002). Métodos de análisis de los ritmos biológicos. En: Cronobiología humana. Ritmos y relojes biológicos en la salud y en la enfermedad. D. Golombek (compilador). Ed. Universidad Nacional de Quilmas, Buenos Aires, Argentina., pp31-42.
66. Doornenbal, H.; Tong, A.K.; Murray, N.L. (1988). Reference values of blood parameters in beef cattle of different ages and stages of lactation. *Can. J. Vet. Res.* 52: 99-105.
67. Doxey, D.L. (1977). S.I. units: The new method of recording laboratory results of diagnostic purpose. *Vet. Rec.* 100:555-556.
68. Duncan, J.R. y Prasse, K.W. (1994). *Veterinary Laboratory Medicine. Clinical Pathology*, 3rd. Ames, Iowa Univ. Press, p. 243.
69. Durotoye, L.A.; Fadairo, M.O. y Avwemorue, A.K. (2000). Diurnal variation in blood parameters in the chicken in the hot tropical climate. *Afr. J. Biomed. Res.* 3:143–147.
70. Durr, U.M. y Kraft, W. (1980). *Laboratory Testing in Veterinary Medicine*, Public. Boehringer Mannheim, Munich, p. 130.
71. Egger, C.D.; Muhlbauer, R.C. y Felix, R. (1994). Evaluation of urinary pyridinium crosslink excretion as a marker of bone resorption in the rat. *J. Bone Miner Res.* 9: 1211-1219.
72. Elrod, C.C. y Butler, W.R. (1993). Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable protein. *J. Anim. Sci.*, 71: 694-701.

73. Ettinger, S.J.; Feldman E.C. (2000). Textbook of Veterinary internal medicine. Diseases of the dog and cat, Saunders W. B. Company (eds), Philadelphia, Pennsylvania.
74. Ferguson, J.; Galligan, T.; Blanchard, T. y Reeves, M. (1993). Serum urea nitrogen and conception rate: The usefulness of test information. *J. Dairy Sci.*, 76: 3742-3746.
75. Figala, J. y Tester, J.R. (1990). Chronobiology and Agroecosystems. En: Chronobiology: Its role in Clinical Medicine, General Biology, and Agriculture – Part B. Ed. New York, wiley-Liss Inc., pp. 773-808.
76. Floyd, J.C.; Pek, S.; Schteingart, D.E. y Fajans, S.S. (1974). Diurnal changes of plasma glucose (G), insulin (IRI) and massively obese subjects during fasting. *Diabetes* 33: 371-374.
77. Focan, C.; Bruguerolle, B.; Arnaud, C.; Levi, F.; Mazy, V.; Focan-Henrard, D. y Bouvenot, G. (1988). Alteration the circadian time structure of plasma proteins in patients with inflammation. *Ann. Rev. Chronopharmacol.* 5: 21-24.
78. Folkard, S. (1989). The pragmatic approach to masking. *Chronobiol.* 6: 55-64.
79. Folman, Y.; Neumark, H.; Kaim, M. y Kaufmann, W. (1981). Performance, rumen and blood metabolites in high-yielding cows fed varying protein percents and protected soybean. *J. Dairy Sci.* 64: 759
80. Fordham, D.P.; Rowlinson, P. y McCarthy, T.T. (1988). Oestrus detection in dairy cows by milk temperature measurement. *Res Vet Sci* 44: 366-374.
81. Fruchart, J.C.; Sézille, G. (1981). Lípidos y lipoproteínas. *Acta Bioq. Clin. Lat.* 15: 97–159.
82. Ganong, W.F. (1988). Fisiología Médica. 10^a edición. El manual moderno. México
83. García Sacristán, A. (1995). Fisiología Veterinaria, Interamericana, Madrid, p. 1074.
84. Gatta, D.; Greppi, G.F.; Casini L., y col. (1992). Feeding schedule and daily fluctuations of hematological parameters in horse. *Gesellschaft für Ernährungsphysiologie.* Gottingen, p. 86.
85. Gill, J.; Szwarcoka-Priebe T.; Krupska, U. y Peplowska, Z. (1978). Seasonal Changes in Hematological Indices, Protein and Glycoprotein Levels and in Activity of Some Enzymes in Arabian Horses. *Bulletin del'Academie Polonaise des Sciences. Série des sciences biologiques Cl. V.* 26: 719-723.

86. Gill, J.; Kompanowska-Jezierska, E.; Jakubow, K.; Kott, A. y Szumska, D. (1985). Seasonal changes in the white blood cell system, lysozyme activity and cortisol level in arabian brood mares and their foals. *Comp. Biochem. Physiol.* 81: 511-523.
87. Gill, J. y Kompanowska-Jezierska, E. (1986). Seasonal changes in the red blood cell indices in arabian brood mares and their foals. *Comp. Biochem. Physiol.* 83: 643-651.
88. Gill, J. y Rastawicka M. (1986). Diurnal changes in the hematological indices in the blood of racing Arabian horses. *Polskie Arch. Wet.* 26: 169-179.
89. Golombek, D. (2002). Introducción: La máquina del tiempo. En: *Cronobiología humana. Ritmos y relojes biológicos en la salud y en la enfermedad.* D. Golombek (compilador). Ed. Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires, Argentina. Pp31-42.
90. Gómez Piquer, J. (1992). *Manual Práctico de Análisis Clínicos en Veterinaria*, Mira, Zaragoza, p. 445.
91. Gómez-Tagle, R. (1993). Evaluación del contenido mineral sérico y en pelo de vacas Holstein con problemas reproductivos (vacas repetidoras) en explotación intensiva. *Vet. Mex.*, 24: 346-347.
92. Gordon, C.J. (1993). *Temperature regulation in laboratory rodents* Cambridge University Press, NY.
93. Greig, W.A. and McIntyre W.I. (1979). Diurnal variation in rectal temperature of N'dama cattle in the Gambia. *Br.Vet. J.* 135: 113-118.
94. Greppi, G.F.; Casini, L.; Gatta D.; Orlandi, M. y Pasquini, M. (1996). Daily fluctuations of haematology and blood biochemistry in horses fed varying levels of protein. *Equine Vet. J.* 28:350–353.
95. Gruart, A.; Delgado, M.J.; Escobar, C. y Aguilar Robledo, R. (2002). Los relojes que gobiernan la vida. Ed. *La ciencia /188 para todos*. México. pp.197.
96. Gustafsson, A.H. y Palmquist, D.L. (1993). Diurnal variation of rumen ammonia, serum urea, and milk urea in dairy cows at high and low yields. *J. Dairy Sci.* 76: 475-485.
97. Guyton, S.C. (1991). *Tratado de fisiología médica*. 8va Ed. McGraw-Hill - Interamericana de España, Madrid. pp 1063

98. Habich, G.E. (1982). Análisis de sangre de animales sanos como fuente de información para el manejo de rodeos lecheros. *Prod. Anim.* 2: 130–158.
99. Hafez, E.S.E. (1989). Reproducción e inseminación artificial en animales. 5ª Edición. Nueva Editorial Interamericana, México. pp 694
100. Hahn, G.L. Body temperature rhythms in farm animals: a review and assessment relative to environmental influences. (1987). *Proceedings 11th International Congress Biometereology*, West Lafayette, USA, Sep, Driscoll D and Box EO (eds). SPB Academic Publishing, The Hague, Netherlands, pp. 325-337.
101. Hahn, G.L.; Eigenberg, R.A., Nienaber, J.A. y Littledike, E.T. (1990). Measuring physiological responses of animals to environmental stressors using a microcomputer-based portable datalogger. *J Anim Sci.* 68: 2658–2665.
102. Hair, J.F.; Anderson, R.E.; Tatham, R.L.; Black, W.C. (1999). Análisis Multivariante. Ed. Prentice Hall. Madrid..
103. Halberg, F. y Simpson, H. (1967). Circadian acrophase of human 17-hydroxycorticosteroid excretion referred to midsleep rather than midnight. *Human Biol.*, 39: 405-413.
104. Halberg F. Chronobiology. *Annu Rev Physiol.* (1969) 31:675–725.
105. Halberg, F.; Cornelissen, G.; Bingham, C.; Fujii, S. y Halberg, E. (1977). Glossary of chronobiology. *Chronobiologia* 4 (suppl.1): 1-189.
106. Halberg, E. y Halberg, F. (1980). Chronobiologic study desing in everyday life, clinic and laboratory. *Chronobiología* 7: 95-120.
107. Hardin, P.; Hall, J. y Rosbash, R. (1990). Feedbak of the drosophila period gene product on circadian cycling of its messenger RNA. *Nature* 343: 536-540.
108. Hart, I.C.; Bines, J.A. y Morant, S.V. (1979). Endocrine control of energy metabolism in the cow: correlations of hormones and metabolites in high and low yielding cows for stages of lactation. *J Dairy Sc.*62: 270-277.
109. Haus, E.; Lakatua, D.; Swoyer, J. y Sackett-Lundeen, L. (1983). Chronobiology in hematology and immunology. *Am J Anatomy* 168: 467-517.
110. Haus, E.; Nicolau, G.Y.; Lakatua, D. Y Sackett-Lundeen, L. (1988) Reference values for chronopharmacology. *Annu Rev. Chronopharmacol.* 4: 333-424.

111. Haus, E.; Nicolau, G.; Lakatua, D.J.; Sackett-Lundeen L. y Petrescu, E. (1989). Circadian rhythm parameters of endocrine functions in elderly subjects during the seventh decade to the ninth decade of life. *Chronobiologia* 16: 331-352.
112. Haus, E. Chronobiology of circulating blood cells and platelets. (1992). En: Touitou, Y.; Haus, E. eds. *Biologic Rhythms in Clinical and Laboratory medicine*. Berlin: Springer-Verlag, pp. 504-526.
113. Haus, E. y Touitou, Y. (1992). Principles of clinical chronobiology. En: Touitou, Y. y Haus, E. *Biologic rythms in clinical and laboratory medicine*. Berlin: Springer Verlag, pp 6-27.
114. Haus, E. (1994). Chronobiology of circulating blood cells and plaletes. En: Touitou, Y and Haus, E. *Biologic Rhythms in Clinical and Laboratory Medicine* (Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest. pp. 504-526.
115. Hautecouverture, M.; Slama, G.; Assan, R. y Tchobroustky, G. (1974). Sex diurnal variations in venous blood and plasma insulin levels. Effect of estrogens in men. *Diabetología* 10: 725-730.
116. Herdt, T.H. Variability characteristic and test selection in herd-level nutritional and metabolic profile testing. (2000). *Vet. Clin. North. Am., Food Anim. Pract.* 16: 387-403.
117. Hermida, R.C.; Halberg, F. y Langevin, T.R. (1986). Serial white blood cell counts and chronotherapy according to highest values (macrophases) or by model characteristics (acrophases). In: Halberg F, Reale L, Tarquini B, eds. *Chronobiologic Approach to Social Medicine (Aspetti Medico-Sociali della Cronobiologia)*. Istituto Italiano di Medicina Sociale, Florencia, Italia; pp 327-343.
118. Hermida, R.C. (1987). Chronobiologic data análisis systems with emphasis in chronotherapeutic marker rhythmometry and chronoepidemiologic risk assessment. En: Scheving L.E.; Halberg, F., Ehret, eds. *Chronobiotecnology and Chronobiological Engineering*. NATO ASI series no 120. Dordrecht, The Netherlands: Martinus Nijhoff, pp 88-119.
119. Hertrampf, B.; Pfeiffer, A.; Pourhassan, H.; Schlikker, P.; Bredenfeld, H.; Wischer, E. y Rosing, W. (1978). Studies on normal daily rectal temperature in various breeds of sheep. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 85: 249-259.

120. Hunsaker, W.G.; Reiser, B. y Wolynetz, M. (1977). Vaginal temperature rhythms in sheep. *Int. J. Chronobiol.* 4: 151-162.
121. Igono, M.O.; Molokwu, E.C. y Aliu, Y.O. (1983). Seasonal variations in rectal temperature of Yankasa sheep. *Vet. Res. Commun.* 6: 223-226.
122. Ióvine, E. y Selva, A.A. (1981). *El Laboratorio en la Clínica*, 2ºed., Panamericana, Buenos Aires, p. 1078.
123. Jain, N.C. (1993). *Essentials of Veterinary Hematology*, Lea y Febiger, Philadelphia, p. 417.
124. Japha, A. (1900). Die Leukozyten beim gesunden und krankewnSäugling. *Jahrbuch Kinderheilk.* 52: 242-270.
125. Jonkisz, P. (1999). The influence the ketosis of in calf cows on selected blood parameters of newborns. Doctor`s thesis. R. Wroclaw, (maszynopis) [typescript], [in Polish].
126. Jubb, K.V.F y Kennedy, P.C. (1973). *Patología de los animales domésticos*. Editorial LABOR.
127. Kalinov A. (1984). *El Laboratorio y su Interpretación Semiológica*, 2º ed., López Libreros, Buenos Aires, p. 1209.
128. Kalmus, H. (1935). Periodizitat und autochronie (= ideochronie) als zeitregelnde eigenschaften der organismen. *Biol. General.*, 11: 93-114.
129. Kanabrocki, E.L.; Sothern, R.B.; Scheving, L.E. Halberg, F.; Pauly, J.E., Greco, J.; Nemchausky, B.A. DeBartelo, M.; Kaplan, E.; McCormick, J.B.; Olwin, J.H.; Marks, G.E.; Bird, T.; Redmond, D.P.; Graeber, R.C.; Ferrara, A. y Hrushesky, W.J.M. (1988). Ten-year-replicated circadian profiles for 36 physiological, serological and urinary variables in healthy men. *Chronobiol. Int.* 5: 237-284.
130. Kaneko, J.J. (1989). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 4th ed., Academic Press, San Diego, p. 832.
131. Kanno, Y. (1977). Experimental studies on body temperature rhythm in dogs I. Application of cosinor method to body temperature rhythm (author`s transl) *Nippon JuigakuZasshi.* 39: 69-76.
132. Klerman, E.B.; Gershengorn, H. B.; Duffy, J.F. y Kronauer, R. E. (2002). Comparisons of the variability of three markers of the human circadian pacemaker. *J Biol Rhythms* 17: 181-193.

133. Kolb, E. (1987). *Fisiología Veterinaria*, 3° ed., Acribia, Zaragoza, p. 464–475.
134. Komosa, M.; Flisinska-Bojanowska, A.; y Gill J. (1990). Diurnal changes in the haemoglobin level, red blood cell number and mean corpuscular haemoglobin in foals during the first 13 weeks of life and in their lactating mothers. *Comp. Biochem. Physiol.* 96: 151-155.
135. Kozłowska, K.; Rogowska-Bielicka, W. y Semka, Z. (1981). Calcium, inorganic phosphorus and magnesium in the serum of pregnant cows. *Pol Arch Weter.* 23: 63-70.
136. Kuleta, Z.; Luczak, Z. y Polakowska-Nowak, G. (1993). Values of protein and energy metabolism parameters in cows during postnatal period. *Acta. Acad. Agricult. Tech. Olszt. Vet.* 21: 91-101.
137. Kwiatkowski, T.; Pres, J.; Marcinkowski, K. y Sekuta, B. (1993). The influence of energetic additional feeding of cows during postnatal period on their state of health and productivity. *Med. Wet.* 43: 611-616.
138. Kyle, B.L.; Kennedy, A.D. y Small, J.A. (1998). Measurement of vaginal temperature by radiotelemetry for the prediction of estrus in beef cows. *Theriogenology* 49:1437-1449.
139. Lechowski, R. (1993). The influence of subclinical acidosis of the cows in calf on the state of liver of newborn calves – experimental and field investigation. *S Rozprawy Naukowe i Monografie SGGW*, 183 [in Polish].
140. Leek, B.F. (1999). Digestión en el estómago de los rumiantes. En: *Fisiología de los Animales Domésticos de Dukes* (Swenson MJ, Reece WO Ed.), 2° ed., Uteha, México. Olther, R. y Wiktorsson, H. (1983).
141. Lefcourt, A.M. (1990). Circadian and ultradian rhythms in ruminants: relevance to farming and science. En: *Chronobiology: its role in clinical medicine, General Biology, and Agriculture – Part B*. Ed. New York, Wiley-Liss Inc. Pp. 735-754.
142. Lefcourt, A.M.; Huntington, J.B.; Akers, R.M.; Wood, D.L. y Bitman, J. (1999). Circadian and ultradian rhythms of body temperature and peripheral concentrations of insulin and nitrogen in lactating dairy cows. *Domestic Anim Endocrinol* 16(1): 41-55.
143. Lewis, G.S. y Newman, S.K. (1984). Changes throughout estrous cycles of variables that might indicate estrus in dairy cows. *J Dairy Sci* 67, 146-152.

144. Macaulay, A.S.; Hahn, J.L.; Clark, D.H.; y Sisson, D.V. (1995). Comparison of calf housing types and tympanic temperature rhythms in Holstein calves. *J. Dairy Sci.* 78: 856-862.
145. Malpaux, B.; Robinson, J.E.; Wayne, N.L. y Karsch, F.J. (1989). Regulation of the onset of the breeding season of the ewe: importance of long day and of an endogenous reproductive rhythm. *J. Endocrinol.* 122: 269-278.
146. Maltz, E.; Silanikove, N. y Shalit, U. (1994). Diurnal Fluctuations in Plasma Ions and Water Intake of Dairy Cows as Affected by Lactation in Warm Weather. *Dairy Sci* 77:263-2639.
147. Manston, R. y Allen, W.M. (1981). The use of blood chemistry in monitoring the health of farm livestock. *Brit Vet J* 137: 241-247.
148. Manston, R.; Rowlands, G.J.; Little, W. y Collis, K.A. (1981). Variability of the blood composition of dairy cows in relation to time of day. *J. Agric. Sci.*96: 593.
149. Marcos, E.R. (1980). Determinación de parámetros sanguíneos relacionados con el funcionamiento hepático en ganado lechero: Colesterol, GOT. *Gac. Vet.* XLII353: 537-545.
150. Marques, M.D. y Waterhouse, J.M. (1994). Masking and the evolution of circadian rhythmicity. *Chronobiol. Int.* 11: 146-155.
151. Marques, M.D.; Golombek, D.A. y Moreno, C. (1997). Adaptación temporal. En: *Cronobiología: principios y aplicaciones*. Ed. Universidad de Buenos Aires. Pp.56-97.
152. Mayerbach, H. (1976). A key in experimental and practical medicine. *Arch. Toxicol.* 36: 267-276.
153. Medway, W.; Prier, J.E. y Wilkinson, J.S. (1980). *Patología Clínica Veterinaria*, Uteha, México, p. 532.
154. Méjean, L.; Bicakova-Rocher, A.; Kolopp, M.; Villaume, C.; Levi, F.; Debry, G.; Reinberg, A. y Drouin, P. (1988). Circadian and ultradian rhythms in blood glucose and plasma insulin of healthy adults. *Chronobiol Int* 5: 227-236.
155. Mendel, V.E. y Raghavan G.V. (1964). A study of diurnal temperature patterns in sheep. *J Physiol.* 174: 206-216.
156. Menna Barreto, L.; Benedito-Silva, A.A.; Moreno, C.R.C., Fischer, F.M. y Marquez, N. (1993). Individual differences in night and continuously –rotating

- shiftwork: seeking anticipatory rather than compensatory strategy. *Ergonomics*, 36: 135-140.
157. Meyer, D.J y Harvey, J.W. (2000). El laboratorio en medicina veterinaria. Interpretación y diagnóstico, Ed. Inter-Médica, Buenos Aires, Argentina, pp. 385.
158. Minors, D.S. y Waterhouse, J.M. (1989). Analysis of biological time series. En: *Biological rhythms in clinical practice*. J. Arendt, D.S. Minors y J.M. Waterhouse (eds.) Wriigh, 172-193.
159. Mohr, E.G. y Krzywanek H. (1990). Variation of core-temperature rhythms in unrestrained sheep. *Physiol. Behav.* 48: 467-473.
160. Mohr, E.G. y Krzywanek H. (1995). Endogenous oscillator and regulatory mechanisms of body temperature in sheep. *Physiol. Behav.* 57: 339-347.
161. Moore- Ede, M.C.; Schmelzer, W.S.; Kass, D.A.; y Herd, J.A. (1976). Internal organization of the multicellular animals. *Physiological and biochemical aspects of circadian rhythms*. *Fed. Proc.* 35: 2333-2338.
162. Moore-Ede, Martin C. (1986). Physiology of the circadian timing system: predictive versus reactive homeostasis. *Am. J. Physiol.* 250: R737-R751.
163. Moreno, C.; Fisher, F.M. y Mennna-Barreto, L. (1997). Aplicaciones de la cronobiología. En: *Cronobiología. Principios y aplicaciones*. Ed. Universidad de Buenos Aires, Argentina. pp. 263-280.
164. Mrosovsky, N. (1994). In praise of masking: behaviorl responses of retinally degenerate mice to dim light. *Chronobiol. Int.* 11: 343-348.
165. Naito, Y.; Shindo, N.; Sato, R. y Muratrami, D. (1990). Plasma osteocalcin in preparturient and post postparturient cows: correlation with plasma 1,25 Dihydroxivitamin D, calcium and inorganic phosphorus. *J Dairy Sci.* 73: 3481-3484.
166. Ndibuallonji, B.B. y Godeau, J.M. (1993). La néoglucogénese et les acides aminés chez les ruminants: revue. *Ann. Méd. Vét.* 137: 537-554.
167. Nicpon, J. y Jonkisz, P. (1997). The influence of acid and alkalic indigestion of pregnant cows on calves' health. *Med. Wet.* 53: 208-213.
168. Oldham, J.D.; Broster, W.H.; Napper, D.J. y Siviter, J.W. (1979). The effect of a low-protein ration on milk yield and plasma metabolites in Friesan heifers during early lactation. *Br. J. Nutr.* 42: 149-162.

169. Olther, R. y Berglund, B. (1983). Leucocytes, packed cell volume, glucose, urea, calcium, inorganic phosphorus and magnesium in the blood of dairy cows. *Zbl. Vet. Med.* 30: 530-541.
170. Oregui, L.M.; Fuentes, S. y Arostegui, C. (1988). Niveles séricos (calcio, magnesio, fósforo, cobre y cinc) en vacuno lechero, evolución respecto a la época del año y el estado productivo. *ITEA*, 74: 9-17.
171. Page, T.L. (1989). Masking in invertebrates. *Chronobiol. Int.* 6: 3-11.
172. Panzera, M.; Fazio, E.; Giofré, F.; Piccione, G. y Caola, G. (1992). Variazioni circadiane di alcuni parametri ematochimici nella Bovina Bruna Alpina a stabulazione fissa. *Atti Soc. It. Buiatria.* 24: 101-111.
173. Peterson, R.G. y Walderm, D.E. (1981). Repeatability of serum constituent in Holstein-friesians affected by feeding, age, lactation and pregnancy. *J Dairy Sci.* 70: 2565-2569.
174. Pevet, P. (1987). Environmental control of the annual reproductive cycle in mammals. Role of the pineal gland. *Comp. Physiol. Environm. Adapt.*, 3: 82-100.
175. Piccione, G.; Assenza, A.M.; Fazio, E. y Caola, G. (1993). Periodicità annuale di alcuni parametri ematochimici nel Puledro puro sangue inglese in accrescimento. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Messina.* 30: 47-57.
176. Piccione, G.; Assenza, A.M.; Fazio, E. y Caola, G. (1994a). Andamento circadiano di alcuni metaboliti azotati sierici di calcio, fosforo e ferro nell'Asino di razza Ragusana. *Atti A.S.Sa.V.*, 1: 160-164.
177. Piccione, G.; Fazio, E.; Giofré, F. y Caola, G. (1994b). The circatrigintan progress of some hematochemical parameters in lactating stalled cows. *Proceeding World Buiatrics Congress.* 18: 919-922.
178. Piccione, G.; Assenza, A.M. y Caola, G. (1995). Organizzazione temporale circadiana di alcuni parametri ematochimici nel Coniglio di razza Californiana. *Atti Soc. It. Sci. Vet.* 49: 285-286.
179. Piccione, G.; Assenza, A.M. y Caola, G. (1996a). Periodicità circadiana di alcuni parametri ematochimici in bovine evitelli di razza Brown. *Atti Soc. It. Buiatria.* 28: 415-422.
180. Piccione, G.; Assenza, A.M.; Scribano, P. y Caola, G. (1996c). Organizzazione temporale circasemidiana di alcuni parametri ematochimici, ematologici e della

- temperaturarettale e cutanea nel Cavallo Purosangue inglese. *Atti A.S.Sa.V.*, 3: 17-23.
181. Piccione, G.; Assenza, A.M.; Giofré, F. y Caola, G. (1996). Andamento circannuale di alcuni metaboliti azotati, della glicemia e di calcio e fosforo in cavalli di razza Murgese. *Atti Soc. It. Ippologia*. 13: 61-68.
182. Piccione, G.; Attanzio, G. y Fazio, F. (1998a). The influence of the different exogenous synchronizers on the temporal circadian pattern of some hematochemical parameters in the Sheep. *Proceedings of the 6th Congress of Fe.Me.S.P.Rum*. 14-16 May, Postojna (Slovenia), 469-472.
183. Piccione, G.; D'Anna, M. y Fazio, F. (1998b). Pattern temporale ematochimico ed ematologico nella Capra dirazza Maltese. *Atti S.I.P.A.O.C*. 13: 368-372.
184. Piccione, G.; Fazio, F.; Scribano, P.; y Caola, G. (1998c). La temperatura corporea nel Cavallo Sanfratellano: pattern temporale circasemidiano, circadiano, circatrigintano e circannuale. *Atti Soc. It. Sci. Vet*. 52: 73-74.
185. Piccione, G.; Giofré, F.; Scribano, P. y Caola, G. (1998d). Circatrigintan temporal progress of some hematochemical parameters in the Sheep and in the Goat. *Proceedings of the 6th Congress of Fe.Me.S.P.Rum*. 14-16 May, Postojna (Slovenia), 473-477.
186. Piccione, G.; Giudice, E.; Niutta, P.P. y Caola, G. (1998e). Pattern temporale circatrigintano di alcuni parametri ematochimici ed ematologici nel Suino. *Atti S.I.P.A.S*. 24: 229-235.
187. Piccione, G.; Attanzio, G.; Assenza, A.M.; Calagna, G.; y Caola G. (2000). The temporal pattern of body temperature in the adult cow and calf. *Proceedings of the 8th Congress of Fe.Me.S.P.Rum*. 406-411.
188. Piccione, G.; Assenza, A.M.; Fazio, F.; Giudice, E. y Caola, G. (2001a). Different Periodicities of Some Haematological Parameters in Exercise-Loaded Athletic Horses and Sedentary Horses. *J. Equine Sci*. 12: 17-23.
189. Piccione, G.; Celona, B.; Russo, M.; y Assenza, A.M (2001b). Il ritmo circadiano de lla temperatura corporea nel cane mantenuto in ambiente climatico controllato e in ambiente naturale. *Atti Soc. It. di Fisiologia Veterinaria*. 4: 50-53.
190. Piccione, G. y Caola, G. (2002). Biological rhythm in livestock. *Journal of Veterinary Science*. 3 (3): 145-157.

191. Piccione, G.; Caola, G. y Refinetti, R. (2002a). Maturation of the daily body temperature rhythm in sheep and horse. *Journal of Thermal Biology*. 27: 175-178.
192. Piccione, G.; Caola, G.; y Refinetti, R. (2002b). The circadian rhythm of body temperature of the horse. *Biological Rhythm Research*. 33: 113-119.
193. Piccione, G.; Assenza, A.; Costa, A.; Fazio, F.; Grasso, F y Caola, G. (2003a). Daily rhythms of the body temperature and some haematochemical parameters in donkey. *Slov. Vet. Res.* 40 (2): 71-76.
194. Piccione, G.; Caola, G. y Refinetti, R. (2003b). Daily and estrous rhythmicity of body temperature in domestic cattle. *BMC Physiol.* 3: 7. Published online 2003 July 28. doi: 10.1186/1472-6793-3-7.
195. Piccione G. y Refinetti, R. (2003c). Thermal chronobiology of domestic animals. *Front Biosci.* 8: 258–264.
196. Piccione, G.; Costa, A.; Giudice, E. (2004). Chronobiological aspects of calcium and phosphorus metabolism in dog: clinical-therapeutic implications. *Archivio Veterinario Italiano* 55: 67-74.
197. Pittendrigh, C.S. y Bruce, V.G. (1959). Daily rhythms as coupled oscillator systems and their relation to thermoperiodism and photoperiodism. En: photoperiodism. A. R. Withrow y R. Withrow (eds.) Washinton, AAAS Publ., 55, pp. 475-505.
198. Pittendrigh, C.S. (1960). Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 25:159-184.
199. Pittendrigh, C.S. y Minis, D.H. (1964). The entrainment of circadian oscillations by light and their role as photoperiodic clocks. *Amer. Nat.* 98: 261-294.
200. Pittendrigh, C.S. (1972). Circadian surfaces and the diversity of possible roles of circadian organization in photoperiodic induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 2734-2737.
201. Pittendrigh, C.S. (1981). Entrainment. En: *Handbook of Behavioral Neurobiology D. Biological Rhythms*, vol. 4. J. Aschoff (ed.), New York, Plenum Press, pp. 95-124.
202. Ramasarma, T. (1976). Biogenetic interrelationship of ubiquinone and cholesterol. *Biochem. Soc. Symp.* 35: 245

203. Rao, G.S. y Ramasarma, T. (1971). Rhythmic activity of biogenesis of cholesterol. *Environ. Physiol.* 1: 118.
204. Rasmussen, H. y Gustin, M.C. (1978). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*,28: 307- 391
205. Recabarren, S.E.; Vergara, M.; Llanos, A.J. y Seron-Ferre M. (1987). Circadian variation of rectal temperature in newborn sheep. *J. Dev. Physiol.* 5: 399-408.
206. Redden, K.D.; Kennedy. A.D.; Ingalls, J.R. y Gilson, T.L. (1993). Detection of estrus by radiotelemetric monitoring of vaginal and ear skin temperature and pedometer measurements of activity. *J Dairy Sci* 76: 713-721.
207. Refinetti, R. y Menaker, M. (1992). The circadian rhythm of body temperature. *Physiol Behav.* 51: 613–637.
208. Reinberg, A. y Halberg, F. (1971). Circadian chronopharmacology. *Annu. Re. Pharmacol.* 11: 455:492.
209. Reinberg, A. (1974). Aspects of circannual rhythms in man. En: *Circannual clocks*. E. T. Pengelley (ed.). New York, Academic Press, pp 423-505.
210. Reinberg, A.; Schuller, E.; Deslanerie, N.; Clench, J. y Helary, M. (1977) Rythmes circadiens et circannuels des leucocytes, proteines totales, immunoglobulines A, G, et M. Etude chez neuf adultes jeunes et sains. *Nouv. Prese. Med.* 6: 3819-3823.
211. Reinberg, A. (1979a). Concepts in chronopharmacology. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 32: 51-66.
212. Reinberg, A. (1979b). La cronotoxicologie et la cronofamacologie. *Actualités toxicologiques* (julio): 53-68.
213. Reinberg, A. (1982). La cronofarmacología. *Mundo científico.* 2: 634-646.
214. Reinberg, A. (1992). Concepts in Chronopharmacology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32 : 51-66.
215. Reinberg, A. y Smolensky, M.H. (1993). Introduction to chronobiology. En: *Biological Rhythms and Medicine. Cellular, metabolism, physiopathologic and pharmacological aspects*. New York, Springer-Verlag.
216. Reinhardt, T.A.; Horst, RL. y Goff, J.P. (1988). Calcium, phosphorus, and magnesium homeostasis in ruminants. *Vet Clin North Am, Food Anim Pract.* 4: 331-350.

217. Ricciardino, M.Z.; Scena, C.; Pissinali, R.L. (1997). Relaciones entre parámetros bioquímicos y productivos en terneros lactantes de vacas primíparas Hereford. *Prod. Anim.* 17: 305.
218. Rose, R. (1981). A physiological approach to fluid and electrolyte therapy in the horse. *Equine Vet. J.* 13: 7-14.
219. Rosenberger, G. (1981). Exploración clínica de los bovinos, Ed. Hemisferio Sur SA, Buenos Aires, Argentina, p 463.
220. Rowlands, G.J.; Manston, R.; Pocok, R.M. y Dew, S. (1975). Relationships between stage of lactation and pregnancy and blood composition in a herd of dairy cows and the influences of seasonal change inmanagement on these relationships. *J. Dairy Res.* 4: 1-12.
221. Ruckebush, Y.; Phaneuf, L.P. y Dunlop, R. (1994). Fisiología de pequeñas y grandes especies. Ed. El Manual Moderno, SA de CV México, DF pp. 571.
222. Russel, R.G.G. (1997). The assessment of bone metabolism in vivo using biochemical approaches. *Horm. Metab. Res.* 29: 138-144.
223. Saba, L.; Bialkowski, Z.; Janecki, T. y Junkuszew, W. (1987). Evaluation of some parameters of metabolic profile and fertility of cows in the regions with mineral deficiencies. *Ann. U M C S Sect. DD.* 42: 95-102.
224. Saba, L. y Bis-Wencel, H. (1992). The influence the mineral additives on selected parameters of blood metabolic profile and dairy cows' fertility. *Ann. U M C S Sect. EE.* 10: 277-283.
225. Sabin, F.R.; Cunningham, R.S.; Doan, C.A. y Kindwale, J.A. (1927). The normal rhythm of white blood cells. *Bull Johns Hopkins Hosp.* 37: 14-67.
226. Sandoval, G.L.; Dellamea, S.; Pochon, D.O. y Campos, M.V. (1998). Calcio, fosforo, magnesio y fosfatasa alcalina en vacas lecheras de una región subtropical suplementadas con óxido de magnesio. *Vet. Mex.*, 29: 131-136.
227. Sanni, A.A.; Oyedokun, O.R. y Alaka, O.O. (2000). Preliminary observations on diurnal rhythm in the haematological parameters of male African giant rats (*Cricetomys gambianus*, Waterhouse). *Afr. J. Biomed. Res.* 3:117–120.
228. Sanpedro, D.H.; Vogel O. y Celser, R. (1994). Manejo reproductivo de un rodeo de cría. *Boletín Inform. INTA Mercedes*, Nro. 294.

229. Schalm, O.W. (1981). *Veterinary Haematology*, 4th ed., Lea y Febiger, Philadelphia, p. 664.
230. Schlierf, G. y Raetzer, H. (1972). Diurnal patterns of blood sugar, plasma insulin, free fatty acid and triglyceride levels in normal subjects and patients with type IV hyperlipoproteinemia and the effect of meal frequency. *Nutr Metab* 17: 123-126.
231. Scott, D.; Abu, D.H. y Buchan, W. (1993). Factors effecting urinary pyridinoline and deoxypyridinoline excretion in the growing lamb. *bone*. 14: 807-811.
232. Sheving; L.; Halberg y Kanabroski, E. (1977). Circadian rhythmometry on 42 variables on thirteen presumably young men. *Proc. XII Internat. Chronobiol. Milano*: 47-71.
233. Shumway, R.H. (1988). *Applied statistical time series analysis*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall, pp 379.
234. Siggaard-Andersen, O.; Thode, J. y Wandrup, J. (1980). The concentration of free calcium ions in plasma. *Radiometer AS 79*. Copenhagen, Denmark.
235. Slobodianik, N.H.; Zago, L.; Pallaro, A.N. y Feliu, M.S. (1999). Biochemical parameters and nutritional status. *Biochem. Acta*. 33: 415–427.
236. Smaaland, R. y Laerum, O.D. (1992). Chronobiology of human bone marrow. In: *Biologic Rhythms in Clinical and Laboratory Medicine*. Touitou and Haus (eds), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, , pp. 527-546
237. Smith, L.H. y Their, S.O. (1983). *Pathophysiology. The Biological Principles of Disease*, Saunders, Philadelphia, p. 1508.
238. Smith, B.P. (1996). *Large animal internal medicine*. Mosby Year book Inc. St. Louis, Missouri. 328 pp.
239. Sommer, H. (1975). *Medicina preventiva en vacas lecheras*. *Not. Med. Veterinaria*. 1: 42-63.
240. Stanier, M.W.; Mount, L.E.; y Bligh, J. (1984). *Energy balance and temperature regulation*. Cambridge University Press, Cambridge.
241. Steimbach; G.; Hilhenhaus, M.; Mayersbach, V. y Pesche, W. (1976). Circadian influences on clinical values in man. *Arch. Toxicol.*, 36: 317-272.

242. Stephenson, L.A.; Winger, C.B.; O'Donovan, B.H. y Nadel, E.R. (1984). Circadian rhythms in sweating and cutaneous blood flow. *Amer. J. Physiol.* 246: R321-R324.
243. Stogdale, L. y Gundin, A. (1983). Correlación entre algunos valores de la química sanguínea y los cambios patológicos del organismos animal. *Therios* 1: 38-41.
244. Swenson, M.J. y Reece, W.O. (1999). *Fisiología de los Animales Domésticos de Dukes*, 2º ed., Uteha, México, p. 925.
245. Swoyer, J.; Haus, E.; Lakatua, D.; Sackett-Lundeen, L. y Thompson, M. (1984). Chronobiology in the clinical laboratory. In: Haus E, Kabat J 8eds. *Proceedings of the XV th international Conference of the International Society of Chronobiology*. Basel, Karger 533-543.
246. Swoyer, J.; Irvine, P.; Sackett-Lundeen, L.; Conlin, L.; Lakatua, D.J. y Haus, E. (1989). Circadian hematologic time structure in the elderly. *Chronobiolol. Int.* 6: 131-137.
247. Thomas, P.C. y Kelly, M.E. (1976). The effect of frequency of feeding on milk secretion in the Ayrshire cow. *J. Dairy Res.* 43: 1.
248. Touitou, Y.; Touitou, C.; Bogdan, A.; Chasselut, J.; Beck, H.; y Reinberg, A. (1979). Circadian rhythm in blood variables in elderly subjects. En: Reinberg, A.; Halberg, F. eds. *Chronopharmacology: Advances in the Biosciences*, vol 19. New York: Pergamon Press, pp. 283-290.
249. Touitou, T.; Touitou, C.; Bogdan, A.; Teinberg, A.; Auzaby, A.; beck, H. y guillet, P. (1986). Differences between young and elderly subjects in seasonal and circadian variations of total plasma proteins and blood volume as reflected by hemoglobin, hematocrit and erythrocyte counts. *Clin. Chem.* 2: 801-804.
250. Trevaskis, L.M. y Fulkerson, W.J. (1999). The relationship between various animal and management factors and milk urea, and its association with reproductive performance of dairy cows grazing pasture. *Livestock Prod. Sci.*, 57: 255-265.
251. Tucker, H.A. y Ringer, R.K. (1982). Controlled photoperiodic environments for food animals. *Science*, 216: 1381-1386.

252. Valtorta, S.E.; Gallardo, M.R.A., Castro, H.C. y Castelli, M.E. (1996). Artificial shade and supplementation effects on grazing dairy cows in Argentina. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, 39 (1): 233-236.
253. Valtorta, S.E.; Leva, P.E. y Gallardo, M.R.A. (1997). Effect of different shades on animal well being in Argentina. *International Journal of Biometeorology*, 41 (2): 65-67.
254. Valtorta, S.E.; Leva, P.E.; Diaz, D.C.; Saurit, A.R. y Boggio, J.C. (2000). Variaciones circadianas de las concentraciones séricas de calcio y fósforo en terneros Holando Argentino. *Revista FAVE* 14 (2): 23-29.
255. Van Cauter, E.; Polonsky, K.E. y Scheen, A.J. (1997). Role of circadian rhythmicity and sleep in human glucose regulation. *Endocrine reviews* 18 (5): 716-738.
256. Watson, T.D. (1994). Sueros lipémicos. *Selecc. Vet.* 2: 157–160.
257. Wilhelm, R.R. (1985). Perfiles bioquímicos de los animales domésticos. *Monografías Med. Vet.* 7: 5-16.
258. Williams, W.J.; Beutler, E. y Erslev, A.J. (1990). *Hematology*, 4th ed., McGraw–Hill, New York, p. 255–363.
259. Yashiki, K.; Kusunose, R. y Takagi, S. (1995). Diurnal variations of blood constituents in young thoroughbred horses. *J. Equine Sci.* 6: 91-97.
260. Young, M. (1992). *Molecular genetics of biological rhythms*. Ed. Marcel Decker Inc. New York. pp. 336.
261. Zulley, J.; Wever, R. y Aschoff, J. (1981). The dependence of onset and duration of sleep on the circadian rhythm of rectal temperature. *Pflügers Arch.* 391: 314–318.