

Retención de placenta en vacas lecheras. Concentración de leucocitos circulantes y niveles plasmáticos de cortisol, calcio y magnesio durante el periparto

Retained placenta in cows. Circulating leukocytes concentration, cortisol, calcium and magnesium plasmatic levels during peri-partum

SILVA, J.H.¹; QUIROGA, M.A.¹; LANDA, R.¹

¹Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Campus Universitario, 7000 Tandil, B.A. Argentina.

RESUMEN

En la bibliografía consultada, la retención placentaria en la vaca lechera fue relacionada con una menor infiltración de neutrófilos en los placentomas, debido fundamentalmente a la elevada cortisolemia durante el parto que disminuiría la actividad de neutrófilos sanguíneos. Asimismo, la hipocalcemia disminuiría la actividad leucocitaria, mientras que la hipomagnesemia la incrementaría. Para profundizar esos estudios, se utilizaron 100 vacas Holando Argentino, preñadas. De cada animal se obtuvieron muestras de sangre, durante: a) el pre-parto, b) el pos-parto inmediato y c) a los siete días pos-parto. Se determinó: concentración de leucocitos; porcentajes de neutrófilos y de linfocitos circulantes; calcemia, magnesemia y además, en b), cortisolemia. Como diez de las vacas muestreadas retuvieron placenta, para comparar los resultados se las dividió en dos grupos: Sin y Con retención. Al registrarse heterocedasticidad en los leucocitos de las vacas con retención, se las separó en dos subgrupos: Neutrofílicas y Neutropénicas. El grupo Neutropénicas no respondió con leucocitosis, neutrofilia y linfopenia al parto ($7090 \pm 1129,5 / \text{mm}^3$) ($p < 0.001$), no guardando esa respuesta relación con la cortisolemia hallada en b); la calcemia fue significativamente menor ($p < 0.001$) en el preparto en el grupo [Con RP (NP)] ($7,9 \pm 0,1 \text{ mg}/100 \text{ mL}$) lo que explicaría la alteración de la respuesta leucocitaria. No es posible relacionar la hipomagnesemia encontrada en el posparto de las vacas con retención placentaria con los otros resultados evaluados.

Palabras clave: (retención placentaria), (leucocitos), (cortisol), (calcio), (magnesio).

Correspondencia e-mail: Julio Silva jsilva@vet.unicen.edu.ar

Recibido: 20/07/2015

Aceptado: 18/05/2016

SUMMARY

In the literature, retained placenta in dairy cows has been associated with decreased neutrophil infiltration in placentomas, mainly due to high cortisol levels during partum, which could decrease the activity of blood neutrophils. Similarly, hypocalcemia could decrease the leukocyte activity, while hypomagnesemia increase it. To deepen these studies, 100 pregnant Holando Argentina cows with no history of retained placenta were sampled. Blood samples were taken a) at 15 days pre-partum, b) within 6 hours post-partum, and c) seven days postpartum. In the three periods, Leukocyte Count, Leukocyte Formula, and serum calcium and magnesium were analyzed; in addition, at b), serum cortisol was analyzed. Only 10 cows had retained placenta. To compare the results, they were divided into two groups: without placental retention and with placental retention. Due to data heterocedasticity, the with placental retention group was divided into two subgroups: neutrophilic and neutropenic. The neutropenic group did not show leukocytosis, neutrophilia and lymphopenia at partum ($7090 \pm 1129,5 / \text{mm}^3$) ($p < 0.001$), this response was unrelated with cortisolemias observed at b), while the serum calcium was significant lower ($p < 0.001$) in the prepartum of neutropenic group ($7,9 \pm 0,1 \text{ mg}/100 \text{ mL}$), which would explain the altered leukocyte response. Hypomagnesemia observed at postpartum of cows with retained placenta can not explain the results evaluated.

Key words: (placental retention), (leukocytes), (cortisol), (calcium), (magnesium)

INTRODUCCIÓN

La retención placentaria (RP) en la vaca lechera es una alteración que puede ser el origen de otras patologías reproductivas, tales como metritis, infertilidad o mastitis, con las consiguientes pérdidas económicas que ellas ocasionan^{29,30}.

En el año 1984, Gunnink, J.W., relacionó RP con una menor infiltración de neutrófilos en los placentomas. Posteriormente, otros investigadores^{6,9,10,11,14,15} fueron encontrando cada vez más evidencias sobre la responsabilidad de esos neutrófilos en el desprendimiento de la placenta. Asimismo, se han publicado trabajos en los que se demostró en vacas, durante el parto, una menor actividad de los neutrófilos sanguíneos.^{6,8,14,17,21}

Para diferentes autores, la disfunción de los neutrófilos sanguíneos en el parto estaría determinada por una baja expresión de los antígenos de membrana, causada por los elevados niveles de cortisol plasmático que se registran en ese momento.^{5,13,18,25}

Desde 1980, diversos investigadores han relacionado la influencia de distintos minerales sobre la actividad de los leucocitos sanguíneos. En

experiencias *in vitro* se demostró que la deficiencia de calcio (Ca), tanto extracelular como intracelular, disminuía la diapedesis, la capacidad fagocítica y la producción de interleucinas.^{4,12,13,14,21,23,26,31}

En cuanto al magnesio (Mg), su deficiencia exacerbaría la actividad leucocitaria.^{19,28}

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 100 vacas Holando Argentino, de más de tres pariciones, sin antecedentes de RP, preñadas, pertenecientes a la Escuela Granja Ramón Santamarina, Tandil, provincia de Buenos Aires. La obtención de muestras (sangre y placentomas) se realizó durante una temporada de parición de otoño. Las fechas probables de parto se obtuvieron de las fichas correspondientes a cada animal.

De cada animal se obtuvieron tres muestras de sangre: a) a los 15 días pre-parto, b) dentro de las 6 horas pos-parto, y c) a los siete días pos-parto.

Los procedimientos experimentales en las vacas fueron aprobados por el Comité de Ética para Experimentación Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNICEN.

Las muestras de sangre se extrajeron en tubos de borosilicato, conteniendo heparina sódica como anticoagulante. Alicuotas de cada muestra se centrifugaron y los plasmas obtenidos se conservaron a -32°C hasta su posterior análisis. En todas las muestras obtenidas se realizaron las siguientes determinaciones: i) en sangre total: concentración de Leucocitos y fórmula leucocitaria (porcentual); ii) en plasma: concentraciones de Ca y de Mg. Además, en las muestras colectadas en el período b) (parto) se efectuó la determinación de la concentración de cortisol plasmático.

La concentración de leucocitos se determinó por el método del hemocitómetro; la fórmula leucocitaria relativa, mediante el procedimiento de extendidos de sangre coloreados con colorante de Wright; las concentraciones de Ca y de Mg se determinaron por espectrofotometría de absorción atómica. De acuerdo al Protocolo establecido para el análisis, los plasmas se descongelaron, se realizó la desproteinización de cada muestra con T.C.A. 12% y se determinó la concentración plasmática de los minerales por espectrofotometría de absorción atómica

(Horwitz, W., 2000); la cortisolemia se determinó por radio inmuno ensayo (RIA Kit, Coat-a-Count, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA).

Todas las determinaciones se hicieron por duplicado. Los resultados fueron analizados estadísticamente, realizando un Análisis de Variancia (ANOVA) entre grupos en cada período en estudio (Pre-parto, Parto y Pos-parto) mediante el procedimiento PROC GLM del SAS cuarta edición, año 2002. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$.

RESULTADOS

Del total de vacas muestreadas, 10 animales retuvieron placenta. El diagnóstico de retención placentaria se efectuó a las 12 horas pos-parto, por lo que los resultados de las dos primeras extracciones (a) a los 15 días pre-parto y (b) dentro de las 6 horas pos-parto se obtuvieron sin tener conocimiento de qué vacas retendrían la placenta.

Luego de la evaluación clínica realizada a las 12 horas pos-parto, los animales se dividieron en dos grupos: sin RP y con RP. En la Tabla 1 se han incluido los distintos parámetros evaluados.

Parámetro	Muestreo	Grupo		Valor p
		Sin RP (n=90) (promedio $\pm$ ES)	Con RP (n=10) (promedio $\pm$ ES)	
[Leucocitos] ($10^3/\text{mm}^3$)	Preparto a)	8950 $\pm$ 252,1 (a)	9131 $\pm$ 366,9 (a)	$p > 0.05$
	Parto b)	16062 $\pm$ 1121,4 (b)	11720 $\pm$ 1720,0 (d)*	$p < 0.05$
	Posparto c)	6890 $\pm$ 115,8 (c)	7130 $\pm$ 543,1 (c)	$p > 0.05$
Neutrófilos (%)	Preparto a)	36,1 $\pm$ 1,9 (e)	27,2 $\pm$ 3,9 (e)	$p > 0.05$
	Parto b)	54,3 $\pm$ 2,0 (g)	38,1 $\pm$ 7,0 (h)*	$p < 0.05$
	Posparto c)	15,2 $\pm$ 2,4 (i)	18,6 $\pm$ 3,8 (i)	$p > 0.05$
Linfocitos (%)	Preparto a)	56,5 $\pm$ 1,3 (j)	66,2 $\pm$ 4,8 (j)	$p > 0.05$
	Parto b)	35,1 $\pm$ 2,4 (k)	50,5 $\pm$ 5,2 (l)*	$p < 0.001$
	Posparto c)	70,8 $\pm$ 2,1 (m)	66,2 $\pm$ 4,1 (m)	$p > 0.05$

Letras distintas entre grupos en cada período difieren estadísticamente

Tabla 1. Concentración de leucocitos y porcentajes de neutrófilos y de linfocitos en los grupos: sin RP y con RP

Al procesar estadísticamente los valores de los leucocitos sanguíneos (Tabla 1), se encontró que, si bien surgían algunas diferencias en el parto, lo más llamativo fue la heterocedasticidad detectada en el grupo con RP, lo que motivó la separación de dicho grupo en dos subgrupos: 4 vacas con RP neutrofílicas ([Con RP (NF)]), y 6 vacas con RP neutropénicas ([Con RP

(NP)]) (Tabla 2). En la citada tabla se puede apreciar dentro del grupo de vacas con RP que el subgrupo [Con RP (NP)] no respondió en el parto con leucocitosis, neutrofilia y linfopenia, manteniendo los valores de leucocitos totales y la fórmula linfocítica / neutropénica determinados en el preparto ($p < 0.001$).

		Sin RP (n=90) (promedio $\pm$ ES)	Con RP		Valor p
			NF (n=4) (promedio $\pm$ ES)	NP (n=6) (promedio $\pm$ ES)	
[Leucocitos] ($10^3/\text{mm}^3$)	Preparto a)	8950 $\pm$ 252,1 (a)	9200 $\pm$ 527,0 (a)	9062 $\pm$ 570,6 (a)	p>0.05
	Parto b)	16062 $\pm$ 1121,4 (b)	16350 $\pm$ 1157,9 (b)	7090 $\pm$ 1129,5 (d)*	p<0.001
	Posparto c)	6890 $\pm$ 115,8 (c)	6210 $\pm$ 834,3 (c)	8050 $\pm$ 115,8 (c)	p>0.05
Neutrófilos (%)	Preparto a)	36,1 $\pm$ 1,9 (e)	27,0 $\pm$ 4,9 (e)	27,4 $\pm$ 6,5 (e)	p>0.05
	Parto b)	54,3 $\pm$ 2,0 (f)	56,8 $\pm$ 2,9 (f)	19,4 $\pm$ 6,3 (g)*	p<0.001
	Posparto c)	15,2 $\pm$ 2,4 (h)	23,0 $\pm$ 5,8 (h)	14,2 $\pm$ 4,5 (h)	p>0.05
Linfocitos (%)	Preparto a)	56,5 $\pm$ 1,3 (i)	61,2 $\pm$ 7,0 (i)	71,2 $\pm$ 6,6 (i)	p>0.05
	Parto b)	35,1 $\pm$ 2,4 (j)	37,4 $\pm$ 1,6 (j)	63,6 $\pm$ 5,6 (k)*	p<0.001
	Posparto c)	70,8 $\pm$ 2,1 (l)	67,6 $\pm$ 6,2 (l)	64,8 $\pm$ 6,0 (l)	p>0.05

Letras distintas entre grupos en cada período difieren estadísticamente

Tabla 2. Concentración de leucocitos y porcentajes de neutrófilos y de linfocitos en los grupos: sin RP y con RP (NF y NP)

En la Tabla 3 se han incluido las concentraciones de Ca, Mg y cortisol (promedio $\pm$ ES) determinadas en los plasmas de las muestras obtenidas en cada uno de los grupos en que finalmente fueron distribuidos los animales del estudio (Sin RP, [Con RP(NF)] y [Con RP (NP)]).

La concentración de calcio determinada en las muestras preparto en el grupo [Con RP (NP)] fue menor que la determinada en los otros grupos (diferencias estadísticamente altamente significativas $p < 0.001$); la concentración de magnesio evidenció un descenso estadísticamente muy significativo ($p < 0.001$) en las muestras obtenidas de los animales del grupo con RP (NF y NP) en el pos-parto en relación al grupo Sin RP. Finalmente, se puede apreciar que existieron diferencias no significativas en las cortisollemias de los distintos grupos, aunque es posible

distinguir una mayor concentración de cortisol en los animales del grupo [Con RP (NP)].

DISCUSIÓN

La respuesta normal de los leucocitos sanguíneos frente al aumento del cortisol que se registra en el parto es leucocitosis con neutrofilia y linfopenia^{5,13,18,25}. Este cuadro se observó en el grupo Sin RP y en el grupo denominado por nosotros [Con RP (NF)], mientras que en el grupo [Con RP (NP)] no existió variación en el recuento ni en la fórmula leucocitaria. Llama la atención esta dispar respuesta de los leucocitos sanguíneos en los dos grupos de vacas con retención placentaria en el momento del parto (tabla 2), la que no guardó relación con los niveles plasmáticos de cortisol (tabla 3), si bien el subgrupo [Con RP(NP)] evidenció el pico más elevado.

Parámetro	Muestreo	Grupo			Valor p
		Sin RP (n=90) (promedio ± ES)	Con RP		
			NF (n=4) (promedio ± ES)	NP (n=6) (promedio ± ES)	
[Ca] (mg/100 mL)	Preparto a)	8,9 ± 0,2 (a)	8,5 ± 0,2 (a)	7,9 ± 0,1 (b)*	p<0.001
	Parto b)	7,5 ± 0,3 (c)	7,3 ± 0,3 (c)	7,0 ± 0,3 (c)	p>0.05
	Posparto c)	8,8 ± 0,2 (d)	8,2 ± 0,4 (d)	8,2 ± 0,02 (d)	p>0.05
[Mg] (mg/100 mL)	Preparto a)	2,0 ± 0,1 (e)	2,1 ± 0,1 (e)	1,8 ± 0,2 (e)	p>0.05
	Parto b)	1,8 ± 0,1 (f)	1,9 ± 0,1 (f)	1,9 ± 0,2 (f)	p>0.05
	Posparto c)	1,8 ± 0,1 (g)	1,2 ± 0,1 (h)*	1,4 ± 0,12 (h)*	p<0.001
[Cortisol] (µg/ mL)	Parto b)	16,0 ± 2,7 (i)	14,8 ± 3,8 (i)	23,0 ± 5,53 (i)	p>0.05

Letras distintas entre grupos en cada período difieren estadísticamente

Tabla 3. Concentraciones de Ca, Mg y cortisol en los grupos: sin RP y con RP (NF y NP).

En la bibliografía consultada por nosotros, no hemos encontrado antecedentes de esta diferente respuesta de los leucocitos sanguíneos en el momento del parto.

Existen trabajos, ya desde la década del 80, que relacionan al calcio con la respuesta leucocitaria. En 1989⁽³²⁾ se comprobó, in vitro, que en ausencia de calcio extracelular la capacidad fagocítica de los macrófagos disminuía un 40 % respecto de los testigos y que, neutralizando el calcio intracelular con Quin 2/AM, se suprimía casi totalmente la fagocitosis de éstos. Asimismo, estos y otros autores demostraron que la diapedesis de los neutrófilos también es dependiente del Calcio, siendo éste necesario para el pasaje de gel a sol de la actina intracitoplasmática^{4,12,23}.

Concomitantemente con estos hallazgos, otros autores⁽¹⁵⁾ observaron en vacas después de una aplicación intramuscular de PTH, leucopenia (atribuible a una neutropenia absoluta y relativa) durante la primera semana pos-parto, disminución de la conglutina sérica durante las primeras 3 semanas posparto, y descenso en la concentración de IgG1 sérica desde la tercera semana pos-parto.

El magnesio tiene dos acciones fundamentales respecto del metabolismo

celular^(20,29): 1) puede formar quelatos con varios ligandos aniónicos como el ATP, el GTP, etc. que son claves para que se realicen numerosas reacciones biológicas y para la mayoría de los procesos de absorción celular de iones; y 2) compite con los iones de calcio por los sitios de unión en las membranas y proteínas. Además, cataliza o activa más de 500 enzimas siendo necesario en la transferencia, almacenamiento y utilización de la energía. El aumento de la $[Mg^{++}]_i$ (concentración intracelular del magnesio iónico) activa una serie de enzimas de distintas vías del metabolismo celular. También regula la síntesis de ADN y se encuentra unido a la red troncal pentosa-fosfato del ADN, jugando un papel vital en la regulación del crecimiento de la célula, división celular, síntesis de proteínas y estructura de la membrana, como así también la permeabilidad de la membrana a ciertos iones como el calcio, fósforo, sodio y potasio. Pero, el déficit de magnesio altera la estabilidad de la membrana celular permitiendo la entrada al citoplasma de iones de calcio y sodio, activando la vía del GMPc que es dependiente de la $[Ca^{++}]_i$ e inhibiendo la del AMPc que es dependiente del magnesio, estimulando la actividad de los leucocitos.

CONCLUSIONES

Hemos verificado la existencia de dos repuestas diferentes de los leucocitos sanguíneos en el momento del parto: una de ellas corresponde a la citada por la literatura^{5,13,18,25} que es leucocitosis con neutrofilia y linfopenia hallada en los grupos SinRP y [Con RP(NF)], mientras que en el grupo [Con RP (NP)] no hay modificación de la concentración de leucocitos ni de la relación neutrófilos/linfocitos. Estas diferentes respuestas no guardan relación con la cortisolemia verificada en los distintos grupos en el parto. Por otro lado, hemos encontrado modificaciones en los niveles de calcio y magnesio en los dos grupos con RP. Respecto del Calcio, su deficiencia tal como se evidencia en el pre-parto del grupo [ConRP(NP)] posiblemente esté involucrada en la alteración de la respuesta leucocitaria, tal como fue comunicado por varios autores^{4,12,23,32}. En cuanto al magnesio, si bien es evidente la hipomagnesemia pos-parto observada en los dos grupos ConRP, no nos es posible explicar su relación con los otros resultados evaluados.

Observaciones:

Dado el escaso número de vacas con RP de este ensayo, se considera que sería necesario reproducir la experiencia con mayor cantidad de animales con retención placentaria para confirmar los resultados informados.

BIBLIOGRAFIA

1. Akar, Y.; Yildiz, H. Concentrations of Some Minerals in Cows with Retained Placenta and Abortion. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 2005; 29: 1157-1162.
2. Arthington, J.D. Trace Mineral Nutrition and Immune Competence in Cattle. *Florida Ruminant Nutrition Symposium*, February 1-2, 2006; Best Western Gateway Grand, Gainesville, FL.
3. Emtenan M.; Hanafi, WM.; Ahmed, HH.; *et al.* An Overview on Placental Retention in Farm Animals. *Middle East J Sci Res*, 2011; 7 (5): 643-651.
4. Feske S. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol.* September 2007; 7: 690-702.
5. Fukuda S.; Mitsuoka H.; Schmid-Schönbein, GW. Leukocyte fluid shear response in the presence of glucocorticoid.; *J Leukoc Biol.* 2004; Apr; 75(4):664-70.
6. Gilbert, RO.; Gröhn, YT.; Guard, CL.; *et al.* Impaired post partum neutrophil function in cows which retain fetal membranes. *Res. in Vet. Sci.* 1993; 55: 15-19.
7. Gunnink, JW. I. Retained placenta and leucocytic activity. II. Pre-partum leucocytic activity and retained placenta. III. Post-Partum leucocytic activity and its relationships to caesarean section and retained placenta. IV. Influence of dilution on the chemotactic properties of cotyledon suspensions. *Veterinary Quarterly* 1984; 6(2): 49-59.
8. Hammon, DS.; Evjen, IM.; Dhiman, TR.. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Vet. Imm. and Immunopath.*, 2006; 113: 21-29.
9. Heuwieser, W.; Grunert, E. Significance of chemotactic activity for placental expulsion in cattle. *Theriogenology*, 1987; 27: 6, 907-912.
10. Heuwieser, W. Pathogenesis of placental retention. *Prakt-Tierarzt* 68: Sondernummer: Collegium Veterinarium 1987; XVII: 39-42.
11. Heuwieser, W.; Woicke, J.; Grunert, E.; *et al.* Importance of chemotactic activity and leukocytic infiltration in placental tissue for the expulsion of fetal membranes in the cow. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 1986; 99: 4, 127-130.
12. Horwitz, W. (2000). Official Methods of Analysis of AOAC International. 17th ed. Vols. 1 and 2. AOAC International, Gaithersburg, MD.
13. Kaneko, K.; Kawakami, S.; Miyoshi, M.; *et al.* Periparturient hypocalcemia in cows: effects on peripheral blood neutrophil and lymphocyte function. *J. Dairy Sci.* 1989; 72: 1188-1196.
14. Kapil, SJ.; Kehrli, ME.; Tyler, HD.; *et al.* Effects of Cortisol and Divalent Cations on CD18 Expression on Bovine Neutrophils. *National Animal Disease Center, Annual Report.* 1995.

15. Kehrli, M.E.Jr, Goff, J.P., Harp, J.A., Thurston, J.R. Effects of preventing periparturient hypocalcaemia in cows by parathyroid hormone administration on haematology, conglutinin, immunoglobulin, and shedding of *Staphylococcus aureus* in milk. *J. Dairy Sci.*, 1990; 73(8):2103-2111.
16. Kimura, K.; Goff, J P.; Kehrli, Jr. ME. Decreased neutrophil function as a cause of retained placenta in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 2002; 85:544-550.
17. Kimura, K., Goff, JP.;Reinhardt, TA. Parturition blunts calcium signals in immune cells. *Great Lakes Immune Fluorescence. Conference*, October 2001; Milwaukee, WI. (abstr).
18. Levkut, M.; Pisl, J.; Revajová, V.; *et al.* Comparison of immune parameters in cows with normal and prolonged involution time of uterus. *Vet. Med.- Czech.*,2002; 47(10-11):277-282.
19. Madsen, SA.; Hickey, MC.; Burton, JL. Glucocorticoids in parturient serum activate steroid receptors to modulate apoptosis in bovine blood neutrophils. *The AAVI Newsletter*, 2004; Vol XXIV, No.1, March.
20. McDowell, LR. *Minerals in Animal and Human Nutrition. 1st Edition.* Academic Press. ISBN 0-12-483369-1; 1992.
21. McEver, R P.; Zhu, C. Rolling cell adhesion. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2010; Nov 10,26:363-96.
22. Miyoshi, M.; Sawamukai, Y.; Iwanaga, T. Reduced Phagocytotic Activity of Macrophages in the Bovine Retained Placenta. *Reprod. Domest. Anim.* 2002; 37 (1):53-56.
23. Miyoshi, M.; Sawamukai, Y. Specific Localization of Macrophages in Pregnant Bovine Caruncles. *Reprod. Domest. Anim.* 2004; 39:125-128.
24. Pettit E. J, Fay F. S. Cytosolic Free Calcium and the Cytoskeleton in the Control of Leukocyte Chemotaxis. *Physiol. Rev.*,October 1998;78: 4, 949-967.
25. Semacan, A.; Sevinç, M. Liver Function in Cows with Retained Placenta. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 2005; 29: 775-778.
26. Serrano, B., Abdelfatah-Hassan, A., Almeria, S., Uriarte, J., Lopez-Gatius, F., Garcia- Ispuerto, I. El Estado de Inmunosupresión Materna Durante el Periodo Periparto Aumenta la Incidencia de Desórdenes Reproductivos Postparto. *XIV Jornadas sobre Producción Animal, AIDA 2011; Tomo I*, 353-355.
27. Silva, J.H.; Quiroga, M. A.; Auza, N.J. Retención placentaria en la vaca lechera. Su relación con la nutrición y el sistema inmune. *Anales RACVAO* (Granada, España) 2002; 15(1):227-240.
28. Spears, J.; Weiss, W. Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. *Vet. J.*, 2008; 176 (1):70-76.
29. Tam, M.; Gómez, S.; González-Gross, M.; Marcos, A. Possible roles of magnesium on the immune system.. *Europ. J. of Clin. Nutr.* 2003; 57: 1193-1197.
30. Trevisi, E.; Ferrari, A. R.; Bertoni, G. Productive and metabolic consequences induced by the retained placenta in dairy cows. *Vet. Res. Commun.* 2008; 32 (Suppl 1):S363-S366.
31. Van Werven, T.; Schukken, Y.H.; Lloyd, J.; Brand, A.; Heeringa, H.T.J.; Shea, M. The effects of duration of retained placenta on reproduction, milk production, postpartum disease and culling rate. *Theriogenology* 1992; 37:1191-1203.
32. Villareal, M.I., Palfrey, H.C. Intracellular calcium and cell function. *Ann. Rev. of Nutr.* 1989; 9:347-376

