

Effect of choline and methionine protected on intake, Lipid Mobilization, Production and composition of milk in Holstein Cows

Efecto de colina y metionina protegidas sobre el consumo, la movilización lipídica, producción y composición de la Leche en Vacas Holstein

Efeito da colina e metionina protegida sobre o consumo, lipid mobilização, produção e composição do leite de vacas da raça Holandesa

Jhon Alejandro Montoya Aguirre¹, Zoot, Msc; Héctor Jairo Correa Cardona², Zoot. PhD; Rubén Darío Galvis Góez³, Zoot. PhD (c).

*Autor para correspondencia: Rubén Darío Galvis Góez. rdgalvis@unal.edu.co

¹ Grupo de Investigación en Interacciones Nutricionales, Metabólicas y Reproductivas en Bovinos. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional, sede Medellín. Colombia.

^{2,3} Profesor Asociado, Departamento de Producción Animal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional, sede Medellín. Colombia.

(Recibido: 29 de julio, 2015; aceptado: 20 de noviembre, 2015)

Abstract

To evaluate the effect of choline and methionine protected in rumen on plasma concentrations of triglyceride (TG), non-esterified fatty acids (NEFAS), β -hydroxybutyrate (BHB); the dry matter intake; production and milk composition, 24 Holstein cows were selected. They were randomly assigned to four treatments: T0: 0.0 g/day of Choline + 0.0 g/day of Methionine, T1: 0.0 g/day of Choline + 15 g/day of Methionine, T2: 15 g/day of Choline + 15 g/day of methionine and T3: 30 g/day Choline + 15 g/day Methionine. The day 270 of pregnancy, calving and days 10 and 20 postpartum, were determined plasma concentrations of TG, NEFAS and BHB; day 270 of gestation, 10 and 20 postpartum was estimated the dry matter intake of forage (DMI_f) and total dry matter intake (DMI_t). The milk production was recorded on days 5, 10, 15 and 20 postpartum and its fat and protein content was determined. The data were analyzed using the PROC MIXED model of SAS for a completely randomized design with repeated measures. Concentrations TG, NEFAS and BHB were significantly higher on day 10 prepartum, calving and 20 days postpartum, respectively ($p < 0.0001$). The BHB was significantly higher in the treatments containing choline and methionine (T2 and T3) ($p = 0.0157$). The DMI_t, milk production and protein percentage were affected by the sampling periods ($p < 0.0001$).

Keywords:

β -hydroxybutyrate lipid metabolism, lipotropic factors, NEFAS, triglycerides.

^oPara citar este artículo: Montoya Aguirre JA, Correa Cardona HJ, Galvis Góez RD. Efecto de colina y metionina protegidas sobre el consumo, la movilización lipídica, de la leche en vacas Holstein. Rev CES Med Zootec. 2015; Vol 10 (2): 179-192.

Resumen

Para evaluar el efecto de Colina y Metionina protegidas en rumen sobre las concentraciones plasmáticas de triglicéridos (TG), ácidos grasos no esterificados (AGNES), β -hidroxibutirato (BHB); sobre el consumo de materia seca; la producción y composición de la leche, se seleccionaron 24 vacas Holstein. Estas fueron asignadas aleatoriamente a cuatro tratamientos: T0: 0, g/día de Colina + 0,0 g/día de Metionina, T1: 0,0 g/día de Colina + 15 g/día de Metionina, T2: 15 g/día de Colina + 15 g/día de Metionina y T3: 30 g/día de Colina + 15 g/día de Metionina. El día 270 de gestación, al parto y los días 10 y 20 posparto, se determinaron las concentraciones plasmáticas de TG, AGNES y BHB; los días 270 de gestación, 10 y 20 posparto se estimó del consumo de materia seca del forraje (CMSf) y el consumo de materia seca total (CMSt). La producción de leche se registró el día 5, 10, 15 y 20 después del parto para determinar el contenido de grasa y proteína. Los datos obtenidos fueron analizados bajo un diseño completamente al azar en un arreglo de medidas repetidas en el tiempo. Las concentraciones de TG, AGNES y BHB fueron significativamente mayores el día 10 preparto, día del parto y 20 posparto, respectivamente ($p < 0,0001$). El BHB fue significativamente más alto en los tratamientos que contenían la combinación Colina y Metionina (T2 y T3) ($p = 0,0157$). El CMSt, la producción de leche y su porcentaje de proteína se afectaron con los periodos de muestreo ($p < 0,0001$).

Palabras clave:

AGNES, β -hidroxibutirato, factores lipotrópicos, metabolismo lipídico, triglicéridos.

Resumo

Para avaliar o efeito de colina e metionina nele rúmen protegidas sobre concentrações sanguíneas de β -hidroxibutirato (BHB) em triglicéridos (TG) plasmáticos e ácidos gordos livres (AGNES) o consumo de matéria; produção e composição do leite, foram selecionadas 24 vacas da raça Holandesa. Eles foram divididos aleatoriamente em quatro tratamentos: T0: 0,0 g / dia de Colina + 0,0 g / dia de metionina, T1: 0,0 g / dia de Colina + 15 g / dia de metionina, T2: 15 g / dia de Colina + 15 g / dia Metionina e T3: 30 g / dia Colina + 15 g / dia de metionina. O dia 270 de gestação, o parto eo pós-parto 10 e 20, os níveis plasmáticos de TG, e AGNES BHB foram determinados; 270 dias de gestação, 10 e 20 pós-parto foi estimado o consumo de matéria seca de forragem (CSPS) e consumo de matéria seca total (CMST). A produção de leite foi registada nos dias 5, 10, 15 e 20 pós-párto, para determinar a gordura e proteína. Os dados obtidos foram analisados sob um delineamento experimental inteiramente casualizado em uma matriz de medidas repetidas ao longo do tempo. Os níveis de TG, e Agnes BHB foram significativamente maiores no dia 10 pré-parto, parto e pós-parto de 20 dias, respectivamente ($p < 0,0001$). A BHB foi significativamente mais elevada nos tratamentos de combinação contendo colina e metionina (T2 e T3) ($p = 0,0157$). A percentagem CMST, produção de leite e proteína foram afetadas pelas épocas de amostragem ($p < 0,0001$).

Palavras chave:

Agnes, β -hidroxibutirato, fatores lipotrópicos, metabolismolipídico, triglicérides.

Introducción

La cadena láctea en Colombia ha llegado a ser un importante sector para el desarrollo agroalimentario del país y una fuente importante de bienestar social y económico en las regiones productoras llegando a abastecer completamente el mercado nacional y generando cada vez más excedentes para la exportación¹⁰. Esto ha sido debido, entre otras causas, a un incremento sostenido en la producción de leche producto de una intensa selección genética, llegando a un nivel tal de

producción en el que el suministro de nutrientes en la dieta, aunado a las reservas de tejido corporal, resultan a menudo insuficientes para suplir los requerimientos del animal y de esta forma mantener una buena salud y una adecuada fertilidad en las vacas¹.

Uno de los momentos críticos en el ciclo productivo de la vaca lechera es el “periodo de transición”, definido como las tres últimas semanas antes del parto (periodo seco

preparto) y las tres primeras semanas después del parto (posparto temprano) ²¹. Este corto periodo de tiempo está acompañado de una gran cantidad de cambios fisiológicos, endocrinos, anatómicos y metabólicos de mayor magnitud a los ocurridos en las demás etapas del ciclo productivo de las vacas.

Además de los aspectos mencionados anteriormente, en muchos hatos lecheros se le presta poca atención al manejo de las vacas en transición, llegando al punto de considerar a la vaca seca dentro de una categoría improductiva de bajos requerimientos, brindándole así una alimentación de escaso contenido de energía disponible y de proteínas, con altos contenidos de fibra de baja digestibilidad ¹². En estas circunstancias el animal queda expuesto a unas condiciones críticas a las cuales trata de adaptarse para suplir las deficiencias en los requerimientos por medio de la movilización de reservas corporales, constituidas principalmente por lípidos concentrados en los adipocitos ^{17, 19} y en menor proporción, por proteínas musculares y minerales óseos ¹⁹.

El fracaso en los procesos de adaptación a estos cambios, resulta en una serie de alteraciones productivas y patológicas que se manifiestan como enfermedades del periparto, entre las que se incluyen síndrome de hígado graso, cetosis, desplazamiento de abomaso, retención de placenta, metritis, mastitis, reducción en la producción y problemas reproductivos ^{4, 8, 16, 14}.

Es de vital importancia para la producción lechera controlar estas afecciones y reducir su incidencia debido al fuerte impacto sobre la estabilidad del sistema lechero, ocasionando una disminución en la producción de leche en los animales que experimentan algunas de las patologías citadas anteriormente, o directamente por el costo que genera tratarlas y las muertes que pueden provocar si no se les controla a tiempo ¹¹.

Debido a que el metabolismo energético es el que presenta mayores probabilidades de alteración, se han realizado muchos esfuerzos en el diseño y evaluación de estrategias de alimentación y uso de aditivos alimenticios que permitan menguar estas alteraciones. En algunos estudios previos la colina y la metionina han mostrado un potencial importante como factores lipotrópicos ^{5, 15, 33}; cuyo mecanismo de acción es la participación en la síntesis y ensamblaje de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, por sus siglas en inglés), facilitando la absorción y el transporte de lípidos desde el hígado ³²; y si bien el alcance de estas investigaciones ha sido

limitado, estas han permitido identificar que es posible la modulación del metabolismo de los ácidos grasos en el hígado a través del suministro de estos factores lipotrópicos. Sin embargo, la dosis, frecuencia y forma de suministro no han sido determinadas claramente.

Es por esta razón que este trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de la adición de colina y metionina en forma protegidas, sobre el consumo de materia seca, la movilización lipídica y la producción y composición de la leche en vacas Holstein durante el periodo de transición.

Materiales y métodos

Localización

El trabajo fue realizado en la estación agraria Paysandú de la Universidad Nacional, sede Medellín, ubicada a 2500 m.s.n.m, con una temperatura promedio de 14°C, con una zona de vida bosque muy húmedo montano bajo (bmh-MB) ¹⁸.

Animales experimentales

Se seleccionó un grupo de 24 vacas de la raza Holstein en gestación (260 días de preñez), entre el segundo y sexto parto.

Dieta

Los animales pastorearon en un sistema rotacional por franjas en praderas de kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), con un estado de madurez de 35-40 días aproximadamente, sometidas al manejo tradicional con fertilización nitrogenada.

Composición del alimento concentrado

El alimento concentrado fue elaborado en la planta de concentrado de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. En la Tabla 1 los ingredientes que fueron utilizados para su elaboración y el porcentaje de inclusión de cada uno de estos tanto para el periodo preparto como para el posparto, de igual forma se presentan los porcentajes de inclusión de los compuestos adicionados al alimento como: óxido de cromo como marcador externo para la determinación del consumo, y Reashure[®], como fuente comercial de Colina (25% de colina) y Aminoshure-M[®] (75% de Metionina) como fuente comercial de metionina.

Tabla 1. Ingredientes utilizados y porcentaje de inclusión de cada uno de estos en la elaboración del concentrado para cada uno de los tratamientos (T0, T1, T2 y T3).

<i>Ingredientes</i>	<i>Tratamientos – parto</i>			
	<i>T0</i>	<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>
	<i>%</i>	<i>%</i>	<i>%</i>	<i>%</i>
Maíz	35	35	35	35
Torta de soya 46.5	5,0	5,0	5,0	5,0
Preparado forrajero feed	30	30	30	30
Salvado de trigo	17	16,1	14,1	11,1
Aceite de palma	2,5	2,5	2,5	2,5
Melaza de caña	7,0	7,0	7,0	7,0
Oxido de cromo	1,0	1,0	1,0	1,0
Cloruro sódico (sal marina)	1,0	1,0	1,0	1,0
Sulfato de magnesio	0,1	0,1	0,1	0,1
Azufre	0,2	0,2	0,2	0,2
Premezcla vitam.	0,1	0,1	0,1	0,1
Inhimol®	0,1	0,1	0,1	0,1
Mycoad®	0,2	0,2	0,2	0,2
Adinox®	0,0125	0,0125	0,0125	0,0125
Aminoshure M®	0	1,0	1,0	1,0
Reashure®	0	0	3,0	6,0

<i>Ingredientes</i>	<i>Tratamientos – posparto</i>			
	<i>T0</i>	<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>
	<i>%</i>	<i>%</i>	<i>%</i>	<i>%</i>
Maíz	35	35	35	35
Torta de soya 46.5	5,0	5,0	5,0	5,0
Preparado forrajero feed	30	30	30	30
Salvado de trigo	15	14,67	13,67	12,67
Aceite de palma	2,5	2,5	2,5	2,5
Melaza de caña	7,0	7,0	7,0	7,0
Oxido de cromo	0,4	0,4	0,4	0,4
Cloruro sódico (sal marina)	1,0	1,0	1,0	1,0
Sulfato de magnesio	0,1	0,1	0,1	0,1
Azufre	0,2	0,2	0,2	0,2
Premezcla vitam.	0,1	0,1	0,1	0,1
Calcita mineral (CaCO3)	2,0	2,0	2,0	2,0
Fosfato mono-bicalcico	1,6	1,6	1,6	1,6
Bicarbonato de sodio	0,1	0,1	0,1	0,1
Inhimol®	0,1	0,1	0,1	0,1
Mycoad®	0,2	0,2	0,2	0,2
Adinox®	0,0125	0,0125	0,0125	0,0125
Aminoshure M®	0	0,33	0,33	0,33
Reashure®	0	0	0	0

Tratamientos

Cada tratamiento estuvo conformado por seis vacas las cuales recibieron suplemento alimenticio con la adición de 20 g de óxido de cromo como marcador externo para la estimación de la producción de heces²². Además les fueron suministrados 2 kg de concentrado por día, repartidos en 2 comidas de 1 kg cada una, a las 7:00 am y 5:00 pm aproximadamente. Dicha suplementación fue suministrada desde el día 260 de gestación hasta el parto (20 días aproximadamente). Con el objetivo de no limitar el aumento gradual en el consumo de concentrado y en la producción de leche que exhiben las vacas en la lactancia temprana, luego del parto la cantidad mínima de concentrado a ofrecer fue de 6 kg/día repartidos en 2 comidas de 3 kg en cada ordeño (2:00 am y 2:00 pm), cuando la vaca alcanza una producción superior a 24 L/d, la suplementación se aumentó manteniendo una relación de 4:1 (litros de leche:kg alimento concentrado). El concentrado adicional a los 6 kg/d fue el suplemento alimenticio básico sin adición de Aminoshure-M[®], Reashure[®], y óxido de cromo. De esta manera la suplementación adicional no alteró el consumo de estos compuestos.

T0: Sin la adición de Metionina ni Colina.

T1: Suplementación con 15 g/día de Metionina.

T2: Suplementación con 15 g/día de Metionina + 15 g/día Colina.

T3: Suplementación con 15 g/día de Metionina + 30 g/día de Colina.

Los tratamientos iniciaron una vez los animales seleccionados cumplieron 260 días de gestación, día en el cual el animal fue pesado por medio de cita métrica, se tomaron fotos para su posterior calificación de condición corporal, y se comenzó con la suplementación alimenticia de acuerdo al tratamiento asignado. Cada tratamiento tuvo una duración total aproximada de 40 días.

Toma de muestras de heces

Muestras de heces fueron colectadas entre los días 257 y 259 del periodo de gestación, tomando 2 muestras por día mañana y tarde, para un total de 6 muestras (aproximadamente 165 g/muestra), que fueron mezcladas para una muestra total de 1000 g aproximadamente. Este muestreo se realizó como control para determinar el cromo basal antes de comenzar a suministrar el marcador (óxido de cromo) en el alimento concentrado. Fueron realizados tres muestreos más los días 268-270 de gestación; 8-10 y 18-20 posparto, siguiendo el mismo procedimiento anterior. Estas muestras se conservaron congeladas y

finalmente llevadas al laboratorio de nutrición animal de la Universidad Nacional, donde fueron secadas a 60°C por 72 horas, luego fueron molidas, la mitad de cada muestra en criba de 1 mm para los respectivos análisis químicos y la otra mitad en criba de 2 mm, que fueron utilizadas para la incubación ruminal *in situ*, y posterior análisis en los residuos de la fibra en detergente ácido (FDA) como marcador interno para estimar el consumo de materia seca total³.

Toma de muestras de forraje y concentrado

Para determinar la calidad composicional de la pastura, se tomaron cinco muestras de pasto de los potreros donde pastoreaban las vacas (aproximadamente 2 kg de forraje verde) y del suplemento alimenticio fueron tomados 300g. Todas las muestras fueron congeladas hasta su análisis en el laboratorio de análisis químico y bromatológico de la Universidad Nacional, Sede Medellín.

Toma de muestras de sangre

Las muestras de sangre para el análisis de los metabolitos fueron colectadas de la vena coccígea (parte anterior de la cola) por medio de tubos al vacío (Vacutainer[®]). Estas muestras fueron tomadas el día 10 preparto (270 de gestación), el día del parto y los días 10 y 20 posparto. Estas muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos para separar el suero y el plasma, los cuales fueron empacados en viales de 2.0 ml y almacenados congelados hasta el momento de los análisis de metabolitos.

Cuantificación del perfil lipídico

En las muestras colectadas de sangre se cuantificaron las concentraciones de Triglicéridos (TG) en plasma mediante la técnica de espectrofotometría utilizando el kit comercial Triglycerides (11528, Biosystems, España); ácidos grasos no esterificados (AGNES) utilizando el kit comercial NEFA FA (115, Randox, Reino Unido) y β -hidroxibutirato (BHB) utilizando el kit comercial RANBUT RB (1008, Randox, Reino Unido). Estos procedimientos se realizaron en el laboratorio de Ciencias Básicas Animales de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

Toma de muestras de leche

Se tomaron muestras de leche los días 5, 10, 15 y 20 posparto mediante un colector WAIKATO[®]. Estas muestras fueron congeladas para su determinación de contenido de grasa y de proteína siguiendo el

procedimiento de Babcock y Milkoscan, respectivamente. Dichos análisis se realizaron en el laboratorio de productos lácteos de la Universidad Nacional, sede Medellín.

Análisis químicos

En las muestras de forraje y concentrado fueron determinados los contenidos de proteína cruda (PC), extracto etéreo (EE) y cenizas mediante los procedimientos descritos por la AOAC (2005)². El contenido de fibra en detergente neutro (FDN), fibra en detergente ácido (FDA) y lignina (Lig) se determinaron por los procedimientos descritos por Van Soest y Robertson (1985)³⁵. En los residuos de la FDN y FDA se determinó el contenido de proteína para obtener la proteína cruda insoluble en detergente neutro (PCIDN) y la proteína cruda insoluble en detergente ácido (PCIDA), respectivamente. Por diferencia se estimó el contenido de carbohidratos no estructurales (CNE)²⁷. Adicionalmente, fue determinada la MS y el contenido de cromo en las muestras de heces.

Estimación de heces producidas

La producción de heces (H) fue calculada utilizando la ecuación propuesta por Lippke, (2002)²²:

$$H.g = \frac{(g \text{ del marcador en el alimento}) * (\text{tasa de recuperación del marcador en heces})}{(\% \text{ de marcador en las heces})}$$

La concentración del marcador en las heces fue corregido por el contenido de cromo en estas durante el periodo pre-experimental, cuando las vacas no recibían óxido de cromo.

Determinación de la FDAiis

Para ello se tomaron bolsas de Nailon de 12 x 4 cm, se marcaron y se pusieron a secar en una estufa a 60°C durante 24 horas; luego se sacaron, se pesaron, y en cada una de estas bolsas se empacaron aproximadamente 3.0 g, repitiéndose este procedimiento cuatro veces por cada una de las muestras de heces recolectadas (para un total de 12 g/muestra) los días 268-270 preparto, 8-10 y 18-20 posparto de cada una de las vacas del experimento. Posteriormente fueron puestas nuevamente las bolsas con la muestra a secar a 60°C durante 24 horas; luego se registró el peso de cada una de las bolsas con la muestra seca, al cual se le restó el peso de la bolsa seca dando como resultado final el peso exacto de la muestra a incubar. Posteriormente se sellaron cada una de las bolsas con amarras y se procedió a realizar la incubación

in situ. Para ello las bolsas fueron fijadas a una cadena de hierro galvanizado por medio de mosquetones y cordeles de cáñamo de 10 cm de longitud. Una vez sujetas a la cadena, fueron introducidas en el rumen de vacas Holstein fistuladas donde permanecieron por un periodo de 144 horas, tiempo después del cual se sacaron, se lavaron con agua limpia y fueron secadas en una estufa a 60°C durante 24 horas. Luego se retiraron los residuos correspondientes a las repeticiones de cada muestra, se mezclaron y se conservaron hasta la realización del análisis químico y bromatológico de la FDAi.

De igual forma se determinó la FDAiis para las muestras de forraje y concentrado colectadas durante el trabajo experimental, aplicando el protocolo anterior, con la diferencia de que para estas muestras se incubaron un total de 17 bolsas por cada una de las muestras, teniendo en cuenta una mayor degradabilidad de estas y para cumplir con la cantidad de residuo exigida por el laboratorio de análisis químico y bromatológico para el análisis de la FDAi.

Estimación del consumo de materia seca del forraje (CMSf) y consumo de materia seca total (CMSt)

Para estimar el CMS proveniente del forraje (CMSf) se utilizó la ecuación propuesta por (Correa *et al.*, 2009)⁷ utilizando los datos de las heces (H) estimadas con Cr corregido por el porcentaje de recuperación en las heces y los de la FDAi obtenidas por el método *in situ* (FDAiis). Se asumió que la tasa de recuperación de la FDAiis en las heces fue del 80%³⁴.

$$CMSf_{kg/vaca/día} = \frac{([FDAih] * H_{kg} / 0.8 - [FDAis] * CMSs)}{[FDAif]}$$

Dónde:

FDAih: Es el porcentaje de FDAi en las heces.

H_{kg}: Cantidad de heces estimadas

0.8: Es la tasa de recuperación de la FDAi en las heces.

FDAis: Es el porcentaje de FDAi en el suplemento.

FDAif: Es el porcentaje de FDAi en el forraje.

El consumo de materia seca total (CMSt) se calculó como la suma del consumo de materia seca del forraje (CMSf) más el consumo de materia seca del suplemento (CMSs):

$$CMSt = CMSf + CMSs$$

Determinación de la degradabilidad de Reashure® y Aminoshure-M® *in situ*

Para La determinación de la degradabilidad de estos dos compuestos, se tomaron tres vacas Holstein fistuladas en rumen, las cuales se encontraban pastoreando praderas de Kikuyo, a las que se les suministro durante cinco días, 1 kg de concentrado comercial que contenía 20 g y 60 g de Aminoshure-M® y Reashure®. Luego de este periodo (día 6) se realizó la prueba de degradabilidad de la siguiente forma: Se tomaron 42 bolsas de Nylon de 12 x 4 cm, se marcaron y se pusieron a secar en una estufa durante 24 horas a 60°C; después de este periodo se sacaron y se pesaron. Luego en cada una de estas bolsas se empacaron aproximadamente 3 g de cada uno de los compuestos (Aminoshure-M® y Reashure®) (21 bolsas/ compuesto) y posteriormente fueron puestas nuevamente las bolsas con la muestra a secar por 24 horas a 60 °C; luego se registró el peso de cada una de las bolsas con el compuesto seco, al cual se le resto el peso de la bolsa seca dando como resultado final el peso exacto de la muestra a incubar. Posteriormente se sellaron cada una de las bolsas con amarras y se procedió a realizar la prueba de degradación *in situ*, incubando tres bolsas/compuesto a los 15 minutos y a las 2, 4, 8, 16, 24 y 48 horas, iniciando con la incubación de las muestras asignadas al tiempo más largo. Al finalizar la prueba, las bolsas fueron sacadas del rumen, lavadas con agua de grifo hasta que esta quedara limpia. Posteriormente estas fueron llevadas al laboratorio y puestas a secar en una estufa por 48h a 60°C. Finalmente se tomaron los residuos de las 3 repeticiones de cada uno de los 7 tiempos, se mezclaron, se empacaron y fueron llevados al laboratorio de Análisis químico y bromatológico para el análisis de nitrógeno y así determinar la degradabilidad de los compuestos.

Análisis estadístico

Las variables de respuesta se sometieron a un análisis de varianza bajo un diseño completamente al azar en un arreglo de medidas repetidas en el tiempo según el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + D_j + T*D_{ij} + E_{ijk}$$

Dónde:

Y_{ijk} = Variable de respuesta

μ = Media experimental

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento

D_j = Efecto del j-ésimo día

$T*D_{ij}$ = Efecto de la interacción entre el i-ésimo tratamiento y el j-ésimo día

E_{ijk} = Error experimental

Para ello se evaluaron tres estructuras de covarianza (Autorregresiva de primer orden, simétrica compuesta y no estructurada)²³ y se utilizó como error para analizar el efecto del tiempo, la repetición (Vaca) anidada en el tratamiento. Así mismo se evaluaron la producción total de leche de la lactancia anterior ajustada a 305 días, el grado de condición corporal al inicio del experimento y el número de partos como covariables. Se aceptó una covariable en el modelo estadístico cuando su inclusión fuera estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Para este análisis se utilizó el PROC MIXED del programa estadístico SAS Institute 2000 (Versión 8.1).

Los parámetros de la cinética de la degradación ruminal del Aminoshure-M® y del Reashure®, se estimaron mediante el modelo de Ørskov y McDonald (1979)²⁸ utilizando el procedimiento RUMENAL⁶.

Resultados

En la tabla 2 se presenta la composición química del forraje y del concentrado consumido por las vacas durante la fase experimental.

Cinética de la degradabilidad ruminal *in situ* del Reashure® y el Aminoshure-M®

En la figura 1 se presenta la cinética de la degradación ruminal *in situ* del Reashure® (colina protegida). Como se puede observar, luego de 48 h de incubación, solo se alcanzó a degradar el 3.2% de esta fuente indicando que es altamente resistente a la fermentación en el rumen. Este valor fue ligeramente más alto que el reportado por Lynch (2008)²⁴ y Kung *et al.* (2003)²⁰ quienes hallaron que el porcentaje de degradación de la MS de este producto fue 2.62% a las 48 h y 2.6% a las 24 h, respectivamente. Brüsmeister y Südekum (2006)³, por su parte, señalaron que la degradabilidad ruminal de este producto no superó el 10% indicando que se trata de un producto con alta resistencia a la fermentación ruminal.

En la figura 2 se presenta la cinética de degradación ruminal *in situ* del Aminoshure-M® (metionina protegida). A diferencia de la colina protegida, este producto presentó una degradabilidad de la MS en el rumen a las 48 h más alta, alcanzando el 55.7%. Overton

et al. (1996)²⁹ reportaron que la degradabilidad ruminal del Mepron M-85[®] fue del 37.5% a las 24 h y del 87.5% a las 96 h. La degradabilidad del Aminoshure-M[®], por el contrario fue de 30.1 y 71.4% a las 24 y 96 h, respectivamente, sugiriendo que se trata de un producto con mayor capacidad de resistir la fermentación en el

rumen que el Mepron M-85[®]. Sin embargo se desconoce la información de digestibilidad intestinal de estos productos, por lo que no se puede afirmar que una mayor cantidad de compuesto que sobrepasa al intestino sea disponible en su totalidad.

Tabla 2. Promedio de la composición química de las praderas de Kikuyo (n=5) y del suplemento alimenticio (n=7) consumidos por las vacas.

<i>Fraciones químicas % de la MS</i>	<i>Pasto Kikuyo</i>	<i>Suplemento</i>
Lignina	4,32	2,43
PCIDA ¹	1,82	0,56
PCIDN	5,24	1,43
Cenizas	9,62	10,0
FDA	32,0	8,19
FDN	61,6	25,2
EE	2,11	6,03
PC	17,3	15,5
CNE ²	14,6	44,7

¹PCIDA: Proteína cruda Insoluble en Detergente Acido; PCIDN: Proteína cruda Insoluble en Detergente Neutro; FDA: Fibra en Detergente Acido; FDN: Fibra en Detergente Neutro; PC: Proteína Cruda; EE: Extracto Etéreo.

$$^2\text{CNE} = 100 - (\text{PC} + \text{FDN} + \text{Cen} + \text{EE}) + \text{PCIDN}$$

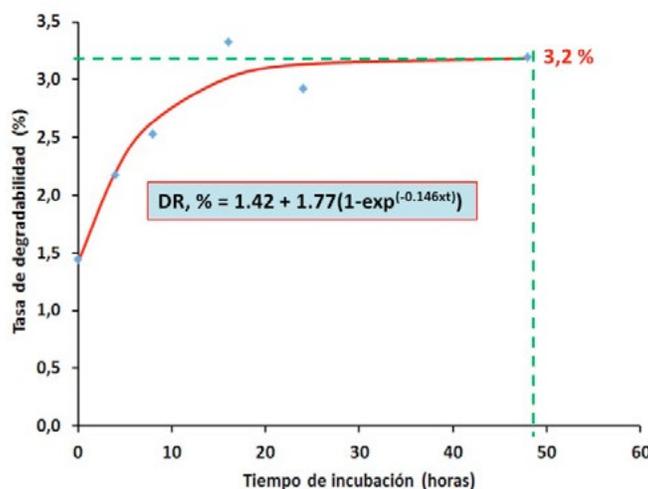


Figura 1. Cinética de la degradabilidad ruminal *in situ* del Reashure[®] a las 48 horas.

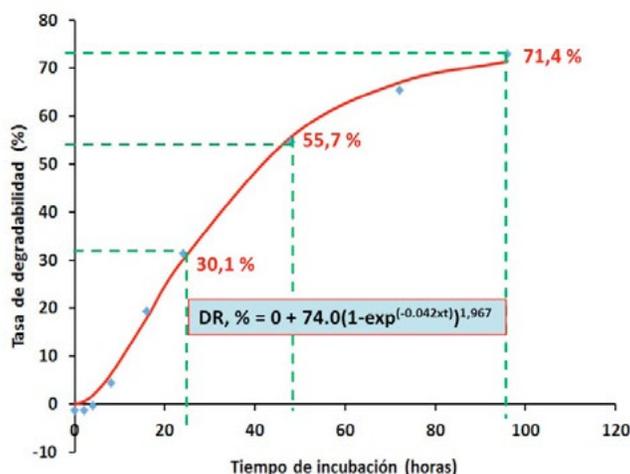


Figura 2. Cinética de la degradabilidad ruminal *in situ* del Aminoshure-M® a las 96 horas.

Efecto del suministro de colina y metionina protegidas sobre el consumo de materia seca del forraje (CMSf) y consumo de materia seca total (CMSt).

En las tablas 3 y 4 se presentan tanto el CMSf como el CMSt para cada uno de los tratamientos y periodos de

muestreo. En general no se presentó interacción entre los tratamientos y los periodos de muestreo en ninguna de las variables evaluadas, por tal razón se midieron los efectos simples (tratamiento o periodos de muestreo) de acuerdo a los resultados del análisis estadístico.

Tabla 3. Medias del CMSf y CMSt de vacas Holstein sometidas a diferentes niveles de inclusión de Colina y Metionina.

<i>Variable</i> (kg/vaca/d)	<i>T0</i>	<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>	<i>EE</i>	<i>P</i>
CMSf	10,5	8,37	10,2	9,74	0,8344	0,3107
CMSt	14,9	12,7	14,7	14,2	0,8273	0,2795

Tabla 4. Medias del CMSf y CMSt de vacas Holstein en diferentes periodos de muestreo.

<i>Variable</i> (kg/vaca/d)	<i>10</i> <i>Preparto</i>	<i>10</i> <i>Posparto</i>	<i>20</i> <i>Posparto</i>	<i>EE</i>	<i>P</i>
CMSf	9,64ab	8,64a	10,8b	0,5858	0,0223
CMSt	11,4a	14,2b	16,7c	0,5934	<0,0001

Medias con letra distinta dentro de la misma fila son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

Metabolitos plasmáticos

En las tablas 5 y 6 se presentan las concentraciones plasmáticas de triglicéridos (TG), ácidos grasos no esterificados (AGNES) y β -hidroxibutirato (BHB) para los tratamientos y periodos de muestreo evaluados.

Producción y composición de la leche.

En las tablas 7 y 8 se presentan la producción total así como el porcentaje de grasa y proteína de la leche para los tratamientos y periodos de muestreo evaluados.

Tabla 5. Medias de las concentraciones plasmáticas de TG, AGNES y BHB de vacas Holstein sometidas a diferentes niveles de inclusión de Colina y Metionina.

<i>Variable</i> (kg/vaca/d)	<i>T0</i>	<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>	<i>EE</i>	<i>P</i>
TG, (mg/dL)	33,4	33,0	31,4	34,2	2,1939	0,5952
AGNES, (mmol/L)	0,16	0,13	0,18	0,18	0,0247	0,4419
BHB, (mmol/L)	0,68a	0,88a	1,16b	0,91ab	0,0942	0,0157

Medias con letra distinta dentro de la misma fila son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$)

Tabla 6. Medias de las concentraciones plasmáticas de TG, AGNES y BHB de vacas Holstein en diferentes periodos de muestreo.

<i>Variable</i> (kg/vaca/d)	<i>10</i> <i>Preparto</i>	<i>Parto</i>	<i>10</i> <i>Posparto</i>	<i>20</i> <i>Posparto</i>	<i>EE</i>	<i>P</i>
TG, (mg/dL)	45,7b	30,2a	26,4a	28,5a	1,4782	<0,0001
AGNES, (mmol/L)	0,12a	0,23c	0,18b	0,13a	0,0174	<0,0001
BHB, (mmol/L)	0,70a	0,72a	1,01b	1,21c	0,0691	<0,0001

Medias con letra distinta dentro de la misma fila son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$)

Tabla 7. Medias de la producción total y los porcentajes de grasa y proteína de la leche de vacas Holstein sometidas a diferentes niveles de inclusión de Colina y Metionina.

<i>Variable</i> (kg/vaca/d)	<i>T0</i>	<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>	<i>D.E</i>	<i>EE</i>	<i>P</i>
Producción total, L/vaca/d	24,2	23,8	22,4	26,5	3,67	1,1912	0,1444
Grasa, %	3,40	3,47	3,73	3,25	0,76	0,2399	0,5963
Proteína, %	2,95	3,08	2,89	2,87	0,28	0,0792	0,2578

Tabla 8. Medias de la producción total y los porcentajes de grasa y proteína de la leche de vacas Holstein en diferentes periodos de muestreo.

<i>Variable (kg/vaca/d)</i>	<i>10 Preparto</i>	<i>10 Posparto</i>	<i>15 Posparto</i>	<i>20 Posparto</i>	<i>EE</i>	<i>P</i>
Producción total, L/vaca/d	20,4a	25,0b	25,2b	26,4b	0,7374	<0,0001
Grasa, %	3,54	3,50	3,30	3,53	0,1764	0,5882
Proteína, %	3,16c	2,94b	2,93b	2,76a	0,0711	<0,0001

Medias con letra distinta dentro de la misma fila son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

Discusión

Consumo de materia seca (CMS)

Como se puede observar en la tabla 3, los consumos de materia seca del forraje y materia seca total no se vieron afectados por la inclusión de las dosis de colina y metionina protegidas utilizadas en este experimento durante el periodo de transición a la lactancia. Lo que sugiere que el CMS no fue sensible al suministro de estos dos compuestos durante este periodo.

Resultados similares han sido reportados por otros autores evaluando la suplementación de vacas durante el periparto cuyos periodos variaron entre el día -21 hasta el día 63 posparto, con dosis de colina protegida en rumen (CPR) que oscilaron entre 15 y 90 g/vaca/día^{9, 30, 31, 36, 37}. Esta falta de efecto de la suplementación de CPR sobre el CMSf y CMSst es de esperarse toda vez que no existe una conexión entre el uso metabólico de la Colina y el CMS. Por otro lado Girard *et al.* (2005)¹³, quienes trabajaron con vacas Holstein alimentadas con una ración totalmente mezclada y que fueron suplementadas con 9 g/día de MPR (Smartamine-M™) desde un mes antes del parto y con 18 g/día durante toda la lactancia, sin evidenciar efecto de este tratamiento sobre el CMS de la ración. Igualmente Overton *et al.*, (1996)²⁹, suplementaron vacas Holstein desde 7 a 10 días preparto hasta la semana 18 posparto con 20 g/día de MPR (Mepron M-85®) y reportaron que dicha suplementación no tuvo ningún efecto sobre el CMS.

Según Sharma y Erdman (1988b)³³, solo en uno de sus trabajos reportaron que altas cantidades de colina (> 280 g/día) afectaron negativamente el CMS, sin embargo esta suplementación fue realizada con colina sin protección (cloruro de colina), lo que los llevo a suministrar una

dosis tan alta, y sugieren que su utilización es poco viable y no recomendable debido a que afecta negativamente el CMS.

En este experimento, se obtuvo una diferencia del CMS entre los periodos de muestreo, los cuales fueron significativamente mayores al día 20 posparto (Tabla 4), lo que pudo ser debido al leve incremento que presenta el animal en el consumo de materia seca del forraje (CMSf) y el consumo de materia seca total (CMSst), a medida que avanza la lactancia.

Metabolitos plasmáticos

Como se puede observar en la tabla 5, los tratamientos no afectaron los TG plasmáticos ni las concentraciones plasmáticas de AGNES, lo que estaría indicando que ni la metionina ni su combinación con colina, mejoraron la síntesis y exportación de VLDL, como era de esperarse y así mismo que ninguno de estos dos compuestos estarían asociados con el grado de movilización de AGNES. Sin embargo, las concentraciones plasmáticas de β -hidroxibutirato si fueron afectadas significativamente por los tratamientos que contenían la combinación metionina y colina, presentando los valores más altos, lo que podría indicar que dicha combinación pudo haber tenido un efecto sobre una mayor incorporación de ácidos grasos a través de la vía de la β -oxidación y por ende mayor producción de cuerpos cetónicos que se vieron reflejados en las concentraciones plasmáticas de BHB.

En contraste a estos resultados Piepenbrink y Overton (2003)³⁰ no encontraron efecto de la adición de 0, 45, 60 y 75 g/día de CPR (Reashure®) en vacas Holstein con una ración totalmente mezclada (RTM) entre los 21 días

preparto y 63 días posparto, sobre las concentraciones plasmáticas de BHB reportando valores que oscilaron entre 1.1 y 1.3 mmol/L. Sin embargo, aunque estos autores no encontraron diferencias entre los tratamientos evaluados para este metabolito, al analizar la incidencia de trastornos de salud encontraron que un mayor número de vacas alimentadas con 60 g/d de CPR presentaron numéricamente la mayor incidencia de desplazamiento de abomaso y de cetosis, aunque los autores sugieren que dichos resultados podrían ser producto del azar y no del tratamiento.

Por otro lado, como se observa en la tabla 6, los TG plasmáticos difirieron entre los periodos de muestreo, siendo significativamente mayores el día 10 preparto y aunque en los demás periodos de muestreo estos valores son mucho menores, se encuentran dentro del rango para vacas con hígado sano de acuerdo a los datos de Mostafavi *et al.* (2013)²⁶, quienes reportan que el contenido mínimo de este metabolito en plasma para vacas con hígado sano es de $26,5 \pm 0.001$ mg/dL, lo que indicaría que las vacas evaluadas dentro de este experimento no presentaron acumulación excesiva de este metabolito en hígado y por lo tanto, tampoco se vieron afectadas por la incidencia de lipidosis hepática. Por otro lado, los AGNES se vieron afectados por los periodos de muestreo, siendo significativamente mayores el día del parto, lo que indicaría que hubo movilización de reservas corporales el día del parto. De acuerdo con los valores reportados por Mostafavi *et al.* (2013)²⁶, quienes sugieren que la concentración de AGNES en vacas sanas durante el periparto, debería estar en el rango de 0.23 a 0.33 mmol/L. Según lo anterior los valores hallados en la presente investigación se encuentran por debajo de este rango, lo que indica que las vacas evaluadas no tuvieron una excesiva movilización de AGNES y por lo tanto se podría pensar que tampoco presentaron hígado graso. Las concentraciones plasmáticas de BHB, se vieron afectadas por los periodos de muestreo, siendo significativamente mayores el día 20 posparto. Estos resultados concuerdan con reportes previos de McCarthy *et al.* (2015)²⁵ que indican que los niveles de este metabolito presentan un aumento gradual conforme avanza la lactancia temprana, lo que es debido a la utilización de ácidos grasos para suplir el déficit energético conforme aumenta la producción de leche, sin aumentos comparables en el consumo de materia seca.

Producción y composición de la leche

Como se puede observar en la Tabla 7, los tratamientos no afectaron significativamente la producción total, el porcentaje de grasa y porcentaje de proteína de la leche.

En los resultados obtenidos en la prueba de degradabilidad *in situ*, la cantidad de metionina disponible a nivel intestinal es de aproximadamente 6,6 g y teniendo en cuenta la participación de este aminoácido en diferentes rutas metabólicas, se podría decir que es una cantidad limitante para la síntesis de proteína láctea, así mismo sucede para el caso de la colina, aunque este compuesto presento una mayor disponibilidad a nivel intestinal lo cual no garantiza que haya una mayor absorción, tampoco afecto la producción y composición de la leche. En la Tabla 8, se puede apreciar que los periodos de muestreo presentaron diferencias observándose una tendencia de un aumento progresivo en la producción de leche a medida que avanza la lactancia, el porcentaje de grasa no fue afectado, sin embargo, el porcentaje de proteína si presento diferencias disminuyendo progresivamente a medida que avanza la lactancia, resultado coherente, ya que a medida que avanza la lactancia y aumenta el nivel de producción, el porcentaje de proteína disminuye, debido a un efecto de dilución.

En las condiciones experimentales evaluadas, la inclusión de metionina y su combinación con colina en la dieta de vacas Holstein durante el periodo de transición a la lactancia, no afecto el consumo de materia seca del forraje (CMSf), el consumo de materia seca total (CMSt) ni la producción de leche y su composición. Igualmente, no se afectaron las concentraciones plasmáticas de TG y AGNES. Sin embargo, las concentraciones plasmáticas de BHB fueron afectadas por los tratamientos que contenían la combinación colina y metionina, por lo que en estudios futuros sería necesario evaluar si la inclusión de estos compuestos afecta el transporte de ácidos grasos hacia la mitocondria posiblemente a través de su participación en la síntesis de carnitina.

Referencias

1. Akers RM. 2000. Selection for milk production from a lactation biology viewpoint. *J Dairy Sci* 83(5): 1151-1158.
2. Association of Official Analytical Chemists International (AOAC). 2005. Official methods of analysis of AOAC International. 18th edition. Maryland, USA.
3. Brüsemeister F, Südekum KH. 2006. Rumen-protected choline for dairy cows: The *in situ* evaluation of a commercial source and literature evaluation of effects on performance and interactions between methionine and choline metabolism. *Anim Res Sci* 55(2): 93-104.

4. Calsamiglia S. 2000. Nuevos avances en el manejo y alimentación de la vaca durante el parto. XVI Curso de Especialización FEDNA.
5. Campabadal C, Navarro HA. 1998. Alimentación de la vaca en el periodo de transición. Centro de Investigaciones en Nutrición Animal, Universidad de Costa Rica.
6. Correa HJ. 2004. Rumenal: procedimiento para estimar los parámetros de cinética ruminal mediante la función Solver de Microsoft Excel®. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias; 17(3): 250-254.
7. Correa HJ, Pabón ML, Carulla JE. 2009. Estimación del consumo de materia seca en vacas Holstein bajo pastoreo en el trópico alto de Antioquia. *Livestock Research for Rural Development* 21(4).
8. Erb HN, Grohn YT. 1988. Epidemiology of Metabolic Disorders in the Periparturient Dairy Cow. *J Dairy Sci* 71(9): 2557-2571.
9. Erdman RA, Sharma BK. 1991. Effect of dietary rumen-protected choline in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 74(5): 1641-1647.
10. Fedegan 2009. Recuperado el 15 de Diciembre de 2013, de: http://portal.fedegan.org.co/pls/portal/docs/PAGE/FNG_PORTAL/ESTADISTICAS1/SECTOR%20GANADERO/COMERCIO%20EXTERIOR/EXPORTACIONES%20DE%20LECHE.PDF
11. Frias M, Landi H, Montes D, Palma PF. 2011. Análisis comparativo de la salud y costo en el período vaca parida en rodeos lecheros; *InVet.* 13(2): 17-23. En: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1668-34982 ...
12. Gallardo M, Maciel M, Cuatrín A, Quaino O, Vottero D, et al., 2000. Evaluación de dos sistemas de alimentación para vacas en transición a la lactancia. Efectos sobre la producción y composición química de leche. Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. http://rafaela.inta.gov.ar/anuario2000/a2000_p21.htm
13. Girard CL, Lapierre H, Matte JJ, Lobley GE. 2005. Effects of dietary supplements of folic acid and Rumen-protected methionine on lactational performance and folate Metabolism of Dairy Cows. *J Dairy Sci* 88(2): 660-670.
14. Goff JP, Horst RL. 1997. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J Dairy Sci* 80(7): 1260-1268.
15. González F, Koenekamp I. 2006. Adaptaciones metabólicas hepáticas en el período periparto en vacas de alta producción de leche. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Departamento de Ciencias Animales, Pontificia Universidad Católica de Chile. 40 p.
16. Grummer RR. 1995. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *J Anim Sci* 73(9): 2820-2833.
17. Helguero P, Garcia A, Triay M. 2006. Etapa de transición y la condición corporal después del parto. *Revista Electrónica de Veterinaria Vol. VII, N° 10*, En: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101006.html>.
18. Holdridge. 1978. Clasificación ecológica de bosques; p. 18.
19. Ji P, Dann HM. 2013. Negative Protein Balance: Implications for Transition Cows. *Miner Agricultural Research Institute*; p. 101
20. Kung L, Putnam DE, Garrett JE. 2003. Comparison of commercially available rumen-stable choline products. *J Dairy Sci* 86 (Suppl. 1), 275.
21. Lager MS, Jordan E. 2012. The Metabolic Profile for the Modern Transition Dairy Cow. In: *Mid-South Ruminant Nutrition Conference*. Grapevine, Texas; p. 9-16.
22. Lippke H. 2002. Estimation of Forage Intake by Ruminants on Pasture; *Crop Sci* 42: 869-872 <http://crop.scijournals.org/cgi/reprint/42/3/869.pdf>
23. Littell RC, Henry PR, Ammerman CB. 1998. Statistical Analysis of repeated measures using SAS procedures. *J Anim Sci* 76(4): 1216-1231.
24. Lynch JA. 2008. Rumen Stability of Two Rumen-Protected Choline Products; p 1-5.
25. McCarthy MM, Mann S, Nydam DV, Overton TR, McArt JA. 2015. Concentrations of nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate in dairy cows are not well correlated during the transition period. *J Dairy Sci* 98(9): 6284-6290.

26. Mostafavi M, Seifi HA, Mohri M, Jamshidi A. 2013. Optimal thresholds of metabolic indicators of hepatic lipidosis in dairy cows. *Revue Méd. Vét*; 164(12): 564-571.
27. National Research Council (NRC). 2001. The nutrient requirement of dairy cattle. Seventh edition; National Academy Press, Washington D.C. p. 381.
28. Ørskov ER, McDonald I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage; *J Agric Sci* 92(2): 499-503.
29. Overton TR, LaCount DW, Cicela TM, Clark JH. 1996. Evaluation of a ruminally protected methionine product for lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 79(4): 631-638.
30. Piepenbrink MS, Overton TR. 2003. Liver metabolism and production of cows fed increasing amounts of rumen-protected choline during the periparturient period. *J Dairy Sci* 86(5): 1722-1733.
31. Pinotti L, Baldi A, Politis I, Rebucci R, Sangalli L, et al., 2003. Rumen-protected choline administration to transition cows: Effects on milk production and vitamin E status. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med*; 50(1): 18-21.
32. Santos J. 2009. Feeding Ruminally-Protected Choline to Transition Dairy Cows. University of Florida. <http://www.thecattlesite.com/articles/1920/feeding-ruminallyprotected-choline-to-transition-dairy-cows> [Consulta: Octubre 10 de 2014].
33. Sharma BK, Erdman RA. 1988b. Effects of high amounts of dietary choline supplementation on duodenal choline flow and production responses of dairy cows. *J Dairy Sci* 71(10): 2670-2676.
34. Sunvold GD, Cochran RC. 1991. Technical note: Evaluation of acid detergent lignin, alkaline peroxide lignin, acid insoluble ash, and indigestible acid detergent fiber as internal markers for prediction of alfalfa, bromegrass, and prairie hay digestibility by beef steers; *J Anim Sci* 69(12): 4951-4955.
35. Van Soest PJ, Robertson J. 1985. Analysis of forages and fibrous of the feeds; Cornell University, Ithaca, New York. Laboratory manual for animal science.
36. Xu G, Ye J, Liu J, Yu Y. 2006. Effect of Rumen-protected Choline Addition on Milk Performance and Blood Metabolic Parameters in Transition Dairy Cows. *Asian-Aust. J Anim Sci* 19(3): 390-395.
37. Zahra LC, Duffield TF, Leslie KE, Overton TR, Putnam D, et al., 2006. Effects of Rumen-protected choline and monensin on milk production and metabolism of periparturient dairy cows. *J Dairy Sci* 89(12): 4808-4818.