

Efecto del nivel de complementación con metionina-colina en vacas Holstein durante el periodo de transición sobre las concentraciones hepáticas de triglicéridos, colina y carnitina

R. D. Galvis^{1*}, J. A. Montoya¹, L. V. Madrid¹

Artículo recibido: 23 de octubre de 2017 · Aprobado: 29 de octubre de 2018

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar el potencial lipotrópico de metionina-colina en vacas lecheras durante el periodo de transición, dosis de 20 g/d de una Fuente Comercial Protegida de la Degradación Ruminal (FCPDR) de metionina y sus combinaciones con una FCPDR de colina en dosis de 60 y 120 g/d se suministraron a vacas entre el día 260 de gestación y el día 20 posparto. Estas pastoreaban kikuyo (*Cenchrus clandestinus*) y recibieron un complemento alimenticio. En los días 270 de gestación y 10 y 20 posparto se cuantificaron las concentraciones plasmáticas de ácidos grasos no esterificados (AGNES), β -Hidroxibutirato (BHB) y triglicéridos (TG), así como las concentraciones hepáticas de triacilglicéridos, de colina, carnitina total, carnitina libre y acil carnitina. Durante el parto se presentaron los valores significativamente más altos ($p < 0.05$) de TG plasmáticos y los significativamente más bajos ($p < 0.05$) de AGNES y BHB. Las concentraciones hepáticas de TG, de colina y de las diferentes formas de carnitina no difirieron significativamente entre periodos de muestreo y no se vieron afectadas por la suplementación con metionina-colina. Por su parte, las concentraciones plasmáticas de BHB aumentaron significativamente ($p < 0.05$) con la suplementación conjunta de metionina y colina, lo que sugiere un aumento en la oxidación de ácidos grasos. Se concluye que con concentraciones bajas de AGNES la metionina y colina no son nutrientes limitantes para la exportación de TG desde el hígado a la sangre. Bajo esta condición no se observó lipidosis hepática y como consecuencia la suplementación con metionina-colina no ocasionó efectos significativos sobre las concentraciones hepáticas de TG.

Palabras clave: disturbios metabólicos, factores lipotrópicos, lactancia temprana, lipidosis hepática.

¹ Grupo de Investigación en Interacciones Nutricionales, Metabólicas y Reproductivas en Bovinos, Departamento de Producción Animal, Universidad Nacional de Colombia–Sede Medellín. Calle 59a nro. 63-20, Bloque 50, Medellín (Colombia).

* Autor para correspondencia: rdgalvis@unal.edu.co.

Effect of the level of complementation with methionine-choline in Holstein cows during the transitional period on the hepatic concentrations of triglycerides, choline and carnitine

ABSTRACT

In order to evaluate the lipotropic potential of methionine-choline in dairy cows during the transition period, the effect of supplementation with 20 g / d of a Ruminant Degradation Protected Commercial Source (FCPDR) of methionine was evaluated, and their combinations with a choline FCPDR in doses of 60 and 120 g / day. Cows grazed kikuyo (*Cenchrus clandestinus*) and received a nutritional supplement between day 260 of gestation and day 20 postpartum. On day 270 of gestation and on days 10 and 20 postpartum blood samples and liver biopsy were taken, in which were quantified: Non-esterified Fatty Acids (NEFAs), β -Hydroxybutyrate (BHB) and Triglycerides; And hepatic concentrations of triacylglycerides, choline, total carnitine, free carnitine and acyl carnitine. The highest values ($p < 0.05$) of plasma triglycerides and the significantly lower values ($p < 0.05$) of AGNES and BHB were presented during the prepartum. Hepatic concentrations of triglycerides, choline and different forms of carnitine did not differ significantly between sampling periods, and were unaffected by methionine-choline supplementation. Plasma concentrations of BHB increased significantly ($p < 0.05$) with co-supplementation with methionine and choline, suggesting an increase in fatty acid oxidation. At relatively low concentrations of AGNES, methionine and choline are not limiting nutrients for the exportation of triglycerides from the liver to the blood, therefore under this condition no hepatic lipodosis was observed and consequently methionine-choline supplementation did not cause significant effects on hepatic triglyceride concentrations.

Key words: early lactation, hepatic lipodosis, lipotropic factors, metabolic diseases.

INTRODUCCIÓN

Durante el periodo de transición a la lactancia (3 semanas antes y 3 semanas después del parto), la cantidad de ácidos grasos no esterificados (AGNES) que llega al hígado sobrepasa su capacidad de oxidación. El hígado utiliza los ácidos grasos (AG) principalmente como fuente energética y los excedentes que no realizan oxidación mitocondrial deben ser esterificados e integrados a la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL, por sus siglas en inglés) para ser transportados a los

tejidos demandantes de energía. Durante el periodo de transición a la lactancia ambos procesos, oxidación mitocondrial y ensamblaje de los triglicéridos (TG) a VLDL, pueden verse disminuidos debido a la baja disponibilidad de componentes claves como la metionina, colina y carnitina (Drackley *et al.* 2001; Piepenbrink *et al.* 2004; Piepenbrink y Overton 2003).

La disponibilidad de fosfatidilcolina puede ser un factor limitante en el hígado de las vacas durante la lactancia temprana debido a la depresión en el consumo de

materia seca, la cual limita la ingestión adecuada de nutrientes entre los que se destacan, sus precursores, colina y metionina (Piepenbrink y Overton 2003). Otro factor importante para la eficacia de la suplementación con colina es el nivel de metionina en la dieta; algunas investigaciones que estudiaron la eficacia en la suplementación con colina reportaron niveles de metionina dietaria de 2,1% de la proteína digestible a nivel intestinal (Zom *et al.* 2011), similares a las recomendaciones hechas por la NRC (2001) y Rulquin *et al.* (2001) para este tipo de animales. Entre tanto, se ha estimado que para el pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinus*) los aminoácidos esenciales con menor concentración relativa son, en su orden, lisina y metionina (Clark *et al.* 1992; Correa 2006). En este sentido, la composición de aminoácidos del forraje puede ser utilizada como un indicador del perfil de aminoácidos de la proteína que no es degradada en el rumen (Correa *et al.* 2008; Tedeschi *et al.* 2001); basado en lo cual, es de esperar un bajo aporte de los aminoácidos lisina y metionina para la absorción intestinal en dietas basadas en pasto kikuyo. Bajo esta situación se podría incrementar la capacidad exportadora de TG desde el hígado hacia otros tejidos si durante el periodo de transición se complementan las vacas con niveles bajos de metionina y colina conjuntamente, o si se complementan únicamente con niveles altos de colina. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del nivel de complementación dietaria con metionina y colina sobre la concentración de triacilglicéridos hepáticos.

MATERIAL Y MÉTODOS

La propuesta para la realización de este estudio fue avalada por el comité de ética

en investigación de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, en su comunicación CEMED 200. La fase experimental del estudio se realizó en el centro Paysandú de la Universidad Nacional, sede Medellín, correspondiente a la formación bmh-MB, según la clasificación de Holdridge (Espinal 1977).

Animales y dieta

El estudio se desarrolló con vacas Holstein de dos a seis partos, que se encontraban entre el día 260 de gestación y el 20 posparto, las cuales se pesaron y posteriormente se calificó su condición corporal al inicio y al final del experimento siguiendo metodologías previamente descritas por Edmonson *et al.* (1989) y Hady *et al.* (1994).

La descripción de los animales utilizados en el experimento se detalla en la Tabla 1. Las vacas pastorearon praderas de kikuyo (*Cenchrus clandestinus*) y recibieron un complemento alimenticio, el cual, acorde con el tratamiento, recibía la adición de la respectiva fuente de cada factor lipotrópico: para metionina, Aminoshure-M[®] (75% L-Metionina, Balchem USA) y para colina, Reashure-M[®] (25% de Colina, Balchem USA). La composición de los suplementos alimenticios se describe en la Tabla 2. Se utilizaron 6 animales por tratamiento, los cuales fueron **T0**: grupo control, **T1**: 20 g/d de Aminoshure-M[®], **T2**: 20 g/d de Aminoshure-M[®] + 60 g/d de Reashure-M[®] y **T3**: 20 g/d de Aminoshure-M[®] + 120 g/d de Reashure-M[®]. La caracterización nutricional de los forrajes y de los suplementos alimenticios se describe en Tabla 3. La cinética de la degradación ruminal del Reashure-M[®] y del Aminoshure-M[®] fue descrita previamente por Montoya *et al.* (2015) quienes reportaron una degradabilidad ruminal a las 48 horas de 3,2% para el Reashure[®] y de 55,7% para el Aminoshure[®].

TABLA 1. Descripción de los animales al inicio del experimento.

| | Edad (meses) | Peso (kg) | Condición Corporal | Número de partos |
|---------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| Promedio | 78,4 | 628,5 | 3,4 | 3,5 |
| Desviación estándar | 20,22 | 58,60 | 0,28 | 1,44 |
| Valor mínimo | 58 | 528 | 3 | 2 |
| Valor máximo | 114 | 767 | 4 | 6 |

TABLA 2. Porcentaje de ingredientes utilizados en la formulación de los complementos alimenticios.

| Ingrediente | Preparto % | Posparto % |
|--|-------------------|-------------------|
| Maíz | 35 | 35 |
| Torta de soya (46.5% proteína cruda) | 5 | 5 |
| Corn wet milled subproducts (Ingredion®) | 30 | 30 |
| Salvado de trigo | 11,1 - 17 | 12,7 - 15 |
| Aceite de palma | 2,5 | 2,5 |
| Melaza de caña | 7,0 | 7,0 |
| Carbonato de calcio | - | 2,0 |
| Fosfato mono-di cálcico | - | 1,6 |
| Bicarbonato de sodio | - | 0,1 |
| Cloruro de sodio | 1,0 | 1,0 |
| Sulfato de magnesio | 0,1 | 0,1 |
| Azufre | 0,2 | 0,2 |
| Premezcla de vitaminas y minerales | 0,1 | 0,1 |
| Oxido de cromo | 1 | 0,4 |
| Aminoshure-M® | 0 - 1%* | 0 - 0,33% * |
| Reashure® | 0 - 3 - 6%** | 0 - 1 - 2%** |
| Inhimol p® | 0,10 | 0,10 |
| Mycoad® | 0,20 | 0,20 |
| Adinox p® | 0,01 | 0,01 |
| Total | 100 | 100 |

* Estas concentraciones garantizan un consumo de 20 g/d de Aminoshure-M® (15 g/d de metionina), con consumos de complemento alimenticio de 2,0 y 6,0 kg/d durante el preparto y el posparto respectivamente.

** Estas concentraciones garantizan un consumo de 30 o 60 g/d de Reashure-® (15 o 30 g/d de colina) según el nivel de complementación (bajo o alto), con consumos de complemento alimenticio de 2,0 y 6,0 kg/d durante el preparto y el posparto respectivamente.

TABLA 3. Composición química del pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinus*) y del complemento alimenticio utilizados en la investigación.

| Fracción química (% de la materia seca) | Pasto kikuyo | Complemento alimenticio | |
|--|--------------|-------------------------|----------|
| | | Preparto | Posparto |
| Lignina | 4,32 | 2,4 | 2,43 |
| PCIDA | 1,82 | 0,70 | 0,53 |
| PCIDN | 5,24 | 1,40 | 1,43 |
| Cenizas | 9,62 | 7,96 | 10,0 |
| FDA | 32,0 | 9,1 | 8,03 |
| FDN | 61,6 | 27 | 24,9 |
| Extracto etéreo (EE) | 2,11 | 5,72 | 6,08 |
| Proteína cruda (PC) | 17,3 | 16,8 | 15,4 |
| CNS | 14,6 | 43,92 | 45,05 |
| Cromo | – | 0,42 | 0,17 |

PCIDA: Proteína cruda insoluble en detergente ácido, PCIDN: Proteína cruda insoluble en detergente neutro, FDN: Fibra en detergente neutro, FDA: Fibra en detergente ácido, CNS: Carbohidratos no estructurales = $100 - (PC + FDN + Cenizas + EE) + PCIDN$ (NRC 2001).

Toma de muestras y determinaciones

De cada vaca se tomaron tres muestras de sangre en tubos con y sin anticoagulante el día 270 de gestación, el día del parto y los días 10 y 20 de posparto, respectivamente. Adicionalmente, en los días 270 de gestación y 10 y 20 de posparto se tomaron biopsias de hígado utilizando el procedimiento descrito por Galvis *et al.* (2016). Las muestras de sangre se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min, se les separó el suero o el plasma (según el caso) y se envasaron en alícuotas de 2,0 ml. Para su transporte las muestras se almacenaron a -10°C y se mantuvieron a -72°C hasta su análisis.

En las muestras de suero se cuantificaron las concentraciones de AGNES, β -Hidroxibutirato (BHB) y TG. Para estimar la concentración de AGNES se utilizó el kit espectrofotométrico Randox NEFA Fa-115 (Randox[®], UK). Para estimar la concentración de β -hidroxibutirato se utilizó el kit Ranbut RB 1008 (Randox[®], UK). Para TG se utilizó el kit Triglycerides (Biosystems[®], España). Por su parte, las determinaciones espectrofotométricas se realizaron utilizando un espectrofotómetro Genesys UV-VIS 10S Thermoscientific. Para las muestras de hígado se determinaron las concentraciones de carnitina total, carnitina libre, acilcarnitina y triglicéridos utilizando métodos

descritos previamente (Prieto *et al.* 2006) y colina-fosfolípidos (Galvis *et al.* 2016). Por último, se estimó el balance de energía neta de lactancia (ENL), el cambio de peso y los balances de proteína metabolizable (PM) y de proteína degradable en rumen (PDR) utilizando el software (NRC 2001).

Análisis estadístico

Se realizaron análisis de medidas repetidas en el tiempo utilizando el PROC MIXED del paquete estadístico SAS® (SAS® 1988). Se modelaron las estructuras de covarianza: simétrica compuesta y auto-regresiva de primer orden. Según el criterio de información de Akaike, la estructura de covarianza más adecuada para todas las variables fue la auto regresiva de primer orden. El número de partos, la producción de leche corregida (305d, 2x, EM) en la lactancia anterior y la condición corporal al inicio del experimento fueron involucrados como covariables. La comparación de medias entre tratamientos se realizó mediante la prueba LSD. Se aceptaron diferencias estadísticas cuando $p < 0,05$. El modelo estadístico incluyó los efectos fijos de: tratamiento, periodo de medición y la interacción entre el tratamiento y el periodo de medición.

$$Y_{hijk} = U + \beta_1 + \beta_2 + \beta_3 + T_h + I(T)_i + P_j + T^*P_{hj} + E_{(hijk)}$$

Dónde:

Y_{ijk} = Variable de respuesta del k-ésimo animal en el h-ésimo tratamiento dentro del j-ésimo periodo de medición. U = Media general; β_1 = Efecto de la covariable 1; β_2 = Efecto de la covariable 2; β_3 = Efecto de la covariable 3; T_h = Efecto del h-ésimo tratamiento (1-n); $I(T)_i$ = Efecto del i-ésimo individuo anidado en el tratamiento (1-n); P_j = Efecto del j-ésimo periodo de medición (1-n); T^*P_{hj} = Efecto de la interacción entre el h-ésimo tratamiento y el j-ésimo periodo de medición; $E_{(hijk)}$ = Error experimental.

RESULTADOS

No se presentaron interacciones entre los tratamientos y los periodos de muestreo para ninguna de las variables analizadas. Ninguna de las covariables incluidas tuvo efecto significativo ($p > 0.05$).

En la Tabla 4 se presentan los indicadores metabólicos y el balance nutricional para cada uno de los tratamientos.

La Tabla 5 presenta los indicadores metabólicos y el balance nutricional por periodos de muestreo.

La Tabla 6 describe el efecto del suministro de colina y metionina sobre las concentraciones hepáticas de TG, colina y carnitina para cada uno de los tratamientos.

La Tabla 7 muestra las concentraciones hepáticas de TG, colina y las diferentes formas de carnitina por periodos de muestreo. No se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre periodos.

DISCUSIÓN

Los tratamientos no tuvieron efecto sobre las concentraciones plasmáticas de AGNES, estos resultados concuerdan con los de investigaciones previas (Davidson *et al.* 2008; Hartwell *et al.* 2000; Guretzky *et al.* 2006; Leiva *et al.* 2015; Piepenbrink y Overton 2003); adicionalmente, como también se puede observar en la Tabla 4, los tratamientos no afectaron las concentraciones plasmáticas de TG. Solo se encontraron diferencias respecto a la concentración plasmática de BHB, donde el tratamiento control (T0) y el tratamiento que solo recibió suplementación con metionina (T1) presentaron valores significativamente más bajos. La explicación de estos resultados no radica en el balance nutricional; como se observa en la Tabla 4, los tratamientos no presentaron diferencias significativas respecto a los balances de ENL, PM y PDR.

Como se observa en la Tabla 5, los valores de AGNES alcanzaron su valor máximo el día del parto, esto debido al efecto lipolítico inducido por el cortisol (Weber *et al.* 2013), sin embargo, los niveles de AGNES decrecieron paulatinamente hasta el día 20 posparto a valores similares a los encontrados al día 10 preparto. Entre tanto,

la variación en los TG plasmáticos presentó concordancia entre el balance energético preparto y posparto, con disminución significativa durante el posparto, lo que indica que el cambio en la disponibilidad de nutrientes tiene efectos importantes sobre la síntesis y exportación de TG desde el hígado.

TABLA 4. Medias por tratamiento para los indicadores metabólicos y el balance nutricional en vacas Holstein sometidas a diferentes niveles de inclusión de colina y metionina.

| Variable | T0 | T1 | T2 | T3 | E.E | p |
|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------|--------|
| 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) | 0,68 ^a | 0,88 ^a | 1,16 ^b | 0,91 ^{ab} | 0,0942 | 0,0157 |
| BaENL (Mcal/d) | -0,88 | -4,12 | -2,46 | -2,33 | 1,3812 | 0,40 |
| BaPM (g/d) | 78,50 | -132,24 | 18,82 | -23,88 | 69,303 | 0,19 |
| BaPDR (g/d) | 36,66 | 24,82 | 24,09 | 21,16 | 6,1090 | 0,26 |
| C peso (Kg/d) | -0,238 | -0,843 | -0,512 | -0,514 | 0,2618 | 0,42 |

T0: control, **T1:** 20 g/d Aminoshure®, **T2:** 20 g/d de Aminoshure® + 60 g/d Reashure®, **T3:** 20 g/d de Aminoshure® + 120 g/d Reashure®, EE: máximo valor del error estándar de la media, p: probabilidad de cometer el error Tipo I.

BaENL: balance de energía neta de lactancia, **BaPM:** balance de proteína metabolizable, **BaPDR:** balance de proteína degradable en rumen, **C peso:** cambio estimado de peso vivo.

TABLA 5. Medias por periodos de muestreo para los indicadores metabólicos y el balance nutricional en vacas Holstein sometidas a diferentes niveles de inclusión de colina y metionina.

| Variable | 10 Preparto | Parto | 10 Posparto | 20 Posparto | E.E | p |
|----------------|---------------------|-------------------|----------------------|---------------------|-------|---------|
| TG (mg/dL) | 45,7 ^b | 30,2 ^a | 26,4 ^a | 28,5 ^a | 1,478 | <0,0001 |
| AGNES (mmol/L) | 0,12 ^a | 0,23 ^c | 0,18 ^b | 0,13 ^a | 0,017 | <0,0001 |
| BHB (mmol/L) | 0,70 ^a | 0,72 ^a | 1,01 ^b | 1,21 ^c | 0,069 | <0,001 |
| BaENL (Mcal/d) | 2,83 ^b | - | -5,99 ^a | -4,19 ^a | 1,312 | <,0001 |
| BaPM (g/d) | 251,39 ^c | - | -132,24 ^a | -81,70 ^b | 51,54 | <,0001 |
| BaPDR (g/d) | 86,05 ^b | - | 0,03 ^a | -6,02 ^a | 4,300 | <,0001 |
| C peso (Kg/d) | 0,47 ^b | - | -1,20 ^a | -0,84 ^a | 0,247 | <,0001 |

EE: máximo valor del error estándar de la media, **p:** probabilidad de cometer el error Tipo I, **BaENL:** balance de energía neta de lactancia, **BaPM:** balance de proteína metabolizable, **BaPDR:** balance de proteína degradable en rumen, **C peso:** cambio estimado de peso vivo. Medias con letra distinta dentro de la misma fila son estadísticamente diferentes (p < 0.05).

Por su parte, la concentración hepática de TG no se afectó por la suplementación con metionina y colina (Tabla 6). Sin embargo, se observó una leve tendencia ($p = 0,11$) a su disminución en el tratamiento con dosis altas de colina (T3). En este sentido, la concentración de TG estuvo acorde con lo reportado por otros autores (Gross *et al.* 2013; Kalaitzakis *et al.* 2007; Starke *et al.* 2010) y en un rango de clasificación bajo según Kalaitzakis *et al.* (2007). Los valores reducidos de TG hallados corresponden con la demanda metabólica a la que estuvieron sometidos los animales, pues mientras que en la presente investigación se encontraron valores de AGNES entre 0,12 y 0,23 mM a lo largo de los periodos de muestreo (Tabla 5), otros autores reportaron que los valores de AGNES tuvieron una alta correlación (0,616; $p < 0,05$) con el grado de infiltración de triglicéridos hepáticos y solo observaron algún grado de lipodosis con valores de AGNES superiores a 0,25 mM (Kalaitzakis *et al.* 2007). Por su parte, Gross *et al.* (2013) reportaron valores de AGNES de 0,23 y 0,78 mM para las semanas -1 parto y +1 posparto, respectivamente, que se correspondieron con cambios significativos en la concentración de TG hepáticos entre la semana -1 parto (25 mg/g) y la semana +1 posparto (57 mg/g).

De otra parte, Roche *et al.* (2015) reportaron que en vacas en pastoreo el grado de condición corporal en el parto y el nivel de alimentación (75, 100 y 125% de los requerimientos) hasta el primer mes posparto no tuvieron efecto sobre la concentración de TG hepáticos durante las 4 primeras semanas. Bajo las condiciones de pastoreo como las descritas por Roche *et al.* (2015), y como aquellas en las que se llevó a cabo la presente investigación, es probable que se presenten pocas condiciones de riesgo para la lipodosis hepática debido al reducido

reto productivo al que están sometidos los animales; el nivel de producción reportado por estos autores (entre 22,9 y 24,6 kg/d) (Roche *et al.* 2015) es bastante similar al encontrado en la presente investigación.

La reducida respuesta en la concentración de TG hepáticos a las dosis utilizadas de metionina y colina pudo deberse a que con bajos niveles de engrasamiento hepático estos nutrientes no son limitantes para la formación de moléculas transportadoras y su exportación a la sangre, y por lo tanto, la suplementación no originó cambios en las concentraciones hepáticas y plasmáticas de TG. A su vez, la disminución en los triglicéridos plasmáticos después del parto no obedeció a deficiencias en las moléculas transportadoras, sino a una disminución significativa en su síntesis hepática debido al balance nutricional negativo durante este periodo, lo cual se evidenció porque no hubo cambios significativos en la concentración de TG hepáticos entre periodos de muestreo (Tabla 7). De este modo, durante la fase de balance nutricional positivo (parto) aumentó significativamente la síntesis hepática de TG, los cuales no tuvieron limitantes para ser exportados a la sangre y por ende su nivel plasmático fue más alto durante este periodo, lo que permitió que no aumentaran significativamente las concentraciones hepáticas de TG. En el posparto, debido a que no hubo elevaciones dramáticas en las concentraciones de AGNES, su captura hepática no excedió su capacidad de oxidación, por el contrario, durante este periodo se observaron aumentos significativos en BHB, de tal modo que la disponibilidad de AGNES para reesterificación fue mínima, lo cual, sumado a la disminución significativa de la síntesis de novo de ácidos grasos, debido al balance nutricional negativo, posiblemente

TABLA 6. Medias por tratamiento de las concentraciones hepáticas de triglicéridos, colina y carnitina de vacas Holstein sometidas a diferentes niveles de inclusión de colina y metionina.

| Variable | T0 | T1 | T2 | T3 | E.E | p |
|--|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------|-------|
| Triglicéridos (mg/g hígado fresco) | 39,13 | 47,30 | 37,80 | 35,25 | 3,55 | 0,11 |
| Colina (mg/g hígado fresco) | 1,52 ^b | 1,30 ^a | 1,66 ^b | 1,48 ^{ab} | 0,067 | 0,022 |
| Carnitina total (nmol/g hígado fresco) | 114,70 | 115,25 | 110,94 | 117,62 | 15,29 | 0,88 |
| Carnitina libre (nmol/g hígado fresco) | 70,32 | 81,54 | 75,69 | 69,46 | 13,55 | 0,88 |
| Acil-Carnitina (nmol/g hígado fresco) | 43,64 | 44,05 | 40,26 | 48,17 | 21,14 | 0,70 |

T0: control, **T1:** 20 g/d Aminoshure®, **T2:** 20 g/d de Aminoshure® + 60 g/d Reashure®, **T3:** 20 g/d de Aminoshure® + 120 g/d Reashure®, **EE:** máximo valor del error estándar de la media, **p:** probabilidad de cometer el error Tipo I. Medias con letra distinta dentro de la misma fila son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

TABLA 7. Medias por periodo de muestreo de las concentraciones hepáticas de triglicéridos, colina y carnitina de vacas Holstein sometidas a diferentes niveles de inclusión de metionina y colina.

| Variable | 10 Preparto | 10 Posparto | 20 Posparto | E.E | p |
|--|-------------|-------------|-------------|-------|------|
| Triglicéridos (mg/g hígado fresco) | 38,48 | 42,03 | 39,09 | 3,36 | 0,76 |
| Colina (mg/g hígado fresco) | 1,48 | 1,56 | 1,44 | 0,051 | 0,21 |
| Carnitina Total (nmol/g hígado fresco) | 104,91 | 131,50 | 121,98 | 16,53 | 0,52 |
| Carnitina Libre (nmol/g hígado fresco) | 65,32 | 74,29 | 78,61 | 11,12 | 0,35 |
| Acil-Carnitina (nmol/g hígado fresco) | 56,00 | 47,69 | 50,56 | 16,13 | 0,92 |

Medias con letra distinta dentro de la misma fila son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$). **EE:** máximo valor del error estándar de la media, **p:** probabilidad de cometer el error Tipo I.

disminuyó significativamente la síntesis hepática de TG, lo que condujo a una disminución en su exportación a la sangre, que a su vez se notó en una disminución significativa en los TG plasmáticos, lo que permitió que no disminuyeran las concentraciones hepáticas de TG.

Por su parte, otros autores reportaron que la suplementación con 15 g/d de colina protegida de la degradación ruminal (60g/d Reashure®) fue efectiva para prevenir la lipidosis inducida por restricción alimenticia (Cooke *et al.* 2007). A su vez, en el estudio de Zom *et al.* (2011) la suplementación

con 14,4 g/d de colina protegida de la degradación ruminal (60g/d Reashure®) a vacas durante el periodo de transición a la lactancia solo consiguió disminuir la concentración de TG hepáticos en la semana 1 y 4 posparto, cuando las vacas no suplementadas presentaron concentraciones de 75 y 60 mg/g, respectivamente; por el contrario, en la semana -3 preparto y 6 posparto, cuando las vacas presentaron concentraciones de 27 y 40 mg/g, respectivamente, la suplementación fue ineficaz (Zom *et al.* 2011). Estos resultados ponen de manifiesto que la suplementación con colina muestra ser efectiva en condiciones de alto riesgo de lipidosis hepática, por el contrario, a bajas concentraciones de TG hepáticos no existen limitantes para su exportación y por lo tanto, no se encuentra respuesta a la suplementación con colina.

Adicionalmente, se pudo evidenciar que los animales suplementados simultáneamente con metionina y colina presentaron valores más altos de BHB, lo que indica una mayor oxidación de ácidos grasos. La explicación de estos resultados podría ligarse a una mayor disponibilidad de carnitina para la incorporación de ácidos grasos a la β oxidación mitocondrial. En este sentido, es conocida la participación de metionina y colina como donantes principales de grupos metilos (Emmanuel y Kennelly 1984) y la importancia de estos en la síntesis de carnitina (Daily y Sachan 1995), por consiguiente, podría esperarse que el aumento en la disponibilidad de estos precursores aumentara su síntesis. Las concentraciones hepáticas de las diferentes formas de carnitina en los diferentes tratamientos (Tabla 6) estuvieron en el rango reportado por otros autores (Carlson *et al.* 2006; Carlson *et al.* 2007) en vacas que recibieron dosis bajas de L-carnitina (6 g/d); sin embargo, en la

presente investigación no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos. Ahora bien, la interacción entre colina y carnitina es poco conocida en bovinos, Daily y Sachan (1995) encontraron que en ratas y cobayos las concentraciones plasmáticas de BHB se incrementaron con la suplementación con colina, lo que fue interpretado como un indicador de una mayor capacidad de oxidación de ácidos grasos como consecuencia de una mayor disponibilidad de carnitina. Estos resultados sugieren que efectivamente en la presente investigación la suplementación con colina pudo haber aumentado la capacidad de oxidación de ácidos grasos, lo que se evidenció a través del aumento en las concentraciones de BHB, sin que necesariamente se elevaran las concentraciones hepáticas de carnitina, posiblemente debido a que el único tejido que realiza depósitos significativos de carnitina es el musculo, como lo demuestran las concentraciones significativamente más altas en éste tejido en bovinos, en los cuales, los reportes indican que las concentraciones de carnitina en músculo son entre 7 y 8 veces mayores a las encontradas en hígado (Carlson *et al.* 2007).

Finalmente, la suplementación con metionina y colina no consiguió aumentar las concentraciones hepáticas de colina; así, los valores encontrados (entre 1,30 y 1,66 mg/g, véase Tabla 6) son relativamente bajos comparados a los reportados (2,2 y 2,5 mg/g) por Sato *et al.* (2005). Las diferencias con estos autores pueden deberse a un mayor aporte de proteína metabolizable (PM) y colina derivadas de una ración totalmente mezclada. Por su parte, otros autores como Osorio *et al.* (2014) tampoco encontraron efecto de la suplementación con metionina sobre las concentraciones hepáticas de colina. En la presente inves-

tigación no se encontraron respuestas en las concentraciones hepáticas de colina, lo que pudo ser influenciado por el balance de proteína metabolizable (PM) y de energía neta de lactancia (ENL) del tratamiento control (T0) respecto al tratamiento que solo recibió metionina (T1) (Tabla 34). De esta forma, mientras que los tratamientos T2 y T3 presentaron balances de ENL y PM numéricamente más cercanos entre sí, el tratamiento control presentó un balance de ENL aproximadamente 2,5 veces superior con respecto a T2 y T3, y aún más, 4,7 veces superior respecto a T1. Respecto al balance de PM, T0 tuvo un balance positivo (78 g/d), mientras que en T1 se encontró el valor más bajo de todos los tratamientos (-132,24 g/d); bajo esta condición es probable que la utilización de metionina y colina como precursores de otras moléculas biológicamente importantes (carnitina, fosfatidilcolina) reste colina como para conseguir aumentar significativamente su concentración en hígado.

CONCLUSIÓN

Bajo concentraciones relativamente bajas de AGNES y TG hepáticos, la metionina y colina no son nutrientes limitantes para la exportación de TG desde el hígado a la sangre; por consiguiente, bajo esta condición no se observa lipidosis hepática y como consecuencia la suplementación con metionina y colina no ocasiona efectos significativos sobre las concentraciones hepáticas de TG.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por Colciencias en su convocatoria 521 y cofinanciado por la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.

REFERENCIAS

- Carlson DB, Litherland NB, Dann HM, Woodworth JC, Drackley JK. 2006. Metabolic effects of L-carnitine infusion and feed restriction in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci.* 89: 4819–4834. Doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72531-0.
- Carlson DB, McFadden JW, D'Angelo A, Woodworth JC, Drackley JK. 2007. Dietary L-carnitine affects periparturient nutrient metabolism and lactation in multiparous cows. *J Dairy Sci.* 90: 3422–3441. Doi: 10.3168/jds.2006-811.
- Clark H, Klusmeyer TH, Cameron MR. 1992. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. *J Dairy Sci.* 75: 2304–2323. Doi: 10.3168/jds.S0022-0302(92)77992-2.
- Cooke RF, Silva Del Rio N, Caraviello DZ, Bertics SJ, Ramos MH, Grummer RR. 2007. Supplemental choline for prevention and alleviation of fatty liver in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 90: 2413–2418. Doi: 10.3168/jds.2006-028.
- Correa HJ. 2006. Posibles factores nutricionales, alimenticios y metabólicos que limitan el uso del nitrógeno en la síntesis de proteínas lácteas en hatos lecheros de Antioquia. *Liv Res Rural Dev [Internet].* [citado 2017 feb. 11]; 18(43). Disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd18/3/corr18043.htm>.
- Correa HJ, Pabón ML, Carulla JE. 2008. Valor nutricional del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum* Hoechst Ex Chiov.) para la producción de leche en Colombia (Una revisión): I Composición química y digestibilidad ruminal y posruminal. *Liv Res Rural Dev [Internet].* [citado 2017 feb. 11]; 20(4). Disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd20/4/corra20059.htm>.
- Davidson S, Hopkins BA, Odle J, Brownie C, Fellner V, Whitlow LW. 2008. Supplementing limited methionine diets with rumen-protected methionine, betaine, and choline in early lactation Holstein cows. *J Dairy Sci.* 91: 1552–1559. Doi: 10.3168/jds.2007-0721.
- Daily JW, Sachan DS. 1995. Choline supplementation alters carnitine homeostasis in humans and guinea pigs. *J Nutr.* 125: 1938–1944. Doi: 10.1093/jn/125.7.1938.

- Drackley JK, Overton TR, Douglas GN. 2001. Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. *J Dairy Sci.* 84 (Suppl. E): 100-112. Doi: 10.3168/jds.S0022-0302(01)70204-4.
- Edmonson AJ, Lean IJ, Weaver LD, Farver T, Webster G. 1989. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72(1): 68-78. Doi: 10.3168/jds.S0022-0302(89)79081-0.
- Emmanuel B, Kennelly JJ. 1984. Kinetics of methionine and choline and their incorporation into plasma lipids and milk components in lactating goats. *J Dairy Sci.* 67: 1912-1918. Doi: 10.3168/jds.S0022-0302(84)81524-6.
- Espinal LS. 1977. Zonas de vida o formaciones vegetales de Colombia. Bogotá (CO): Subdirección Agrológica, Instituto Geográfico Agustín Codazzi (IGAC).
- Galvis GR, Ramirez N, Giraldo A. 2016. Extracción, cuantificación y distribución de las principales fracciones lipídicas en pequeñas biopsias de hígado de vacas en el periodo de transición. *Rev CES Med Vet y Zootec.* 11(1): 26-38.
- Gross J, Schwarz F, Eder K, Van Dorland A, Bruckmaier RM. 2013. Liver fat content and lipid metabolism in dairy cows during early lactation and during a mid-lactation feed restriction. *J Dairy Sci.* 96: 5008-5017. Doi: 10.3168/jds.2012-6245.
- Hady PJ, Domecq JJ, Kaneene JB. 1994. Frequency and Precision of Body Condition Scoring in Dairy Cattle. *J Dairy Sci.* 77: 1543-1547. Doi: 10.3168/jds.S0022-0302(94)77095-8.
- Hartwell JR, Cecava MJ, Donkin SS. 2000. Impact of dietary rumen undegradable protein and rumen-protected choline on intake, peripartum liver triacylglyceride, plasma metabolites and milk production in transition dairy cows. *J Dairy Sci.* 83: 2907-2917. Doi: 10.3168/jds.S0022-0302(00)75191-5.
- Guretzky NAJ, Carlson DB, Garrett JE, Drackley JK. 2006. Lipid metabolite profiles and milk production for Holstein and Jersey cows fed rumen-protected choline during the periparturient period. *J Dairy Sci.* 89: 188-200. Doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72083-5.
- Kalaitzakis E, Roubies N, Panousis N, Pourliotis K, Kaldrymidou E, Karatzias H. 2007. Clinicopathologic evaluation of hepatic lipidosis in periparturient dairy cattle. *J Vet Intern Med.* 21: 835-845.
- Leiva T, Cooke RF, Brandão AP, Marques RS, Vasconcelos JL. 2015. Effects of rumen-protected choline supplementation on metabolic and performance responses of transition dairy cows. *J Anim Sci.* 93: 1896-1904. Doi: 10.2527/jas.2014-8606.
- Montoya JA, Correa HJ, Galvis RD. 2015. Efecto de colina y metionina protegidas sobre el consumo, la movilización lipídica, producción y composición de la Leche en Vacas Holstein. *Rev CES Med Vet y Zootec.* 10(2): 179-192.
- [NRC] National Research Council. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th Revised Edition. Washington DC (US): National Academy Press.
- Osorio JS, Trevisi E, Ji P, Drackley JK, Luchini D, Bertoni G, Looor JJ. 2014. Biomarkers of inflammation, metabolism, and oxidative stress in blood, liver, and milk reveal a better immunometabolic status in periparturient cows supplemented with Smartamine M or MetaSmart. *J Dairy Sci.* 97: 7437-7450. Doi: 10.3168/jds.2013-7679.
- 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: 1722-1733. Doi: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73758-8.
- Piepenbrink MS, Marr AL, Waldron MR, Butler WT, Overton TR, Vázquez-Añón M, Holt MD. 2004. Feeding 2-Hydroxy-4-(Methylthio)-Butanoic acid to periparturient dairy cows improves milk production but not hepatic metabolism. *J Dairy Sci.* 87: 1071-1084. Doi: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73253-1.
- Prieto JA, Andrade F, Aldámiz-Echevarría L, Sanjurjo P. 2006. Determination of free and total carnitine in plasma by an enzymatic reaction and spectrophotometric quantitation spectrophotometric determination of carnitine. *Clin Biochem.* 39: 1022-1027. Doi: 10.1016/j.clinbiochem.2006.06.005.

- Roche JR, Meier S, Heiser A, Mitchell MD, Walker CG, Crookenden MA, Riboni MV, Loor JJ, Kay JK. 2015. Effects of precalving body condition score and prepartum feeding level on production, reproduction, and health parameters in pasture-based transition dairy cows. *J Dairy Sci.* 98: 7164–7182. Doi: 10.3168/jds.2014-9269.
- Rulquin H, Verite R, Guinard-Flament J. 2001. Acides aminés digestibles dans l'intestin. Le système AADI et les recommandations d'apport pour la vache laitière. *INRA Prod Anim.* 14(4): 265-274.
- [SAS®] SAS Institute Inc. 1988. User's Guide: Statistics, version 7. Cary (NC): SAS Institute Inc.
- Sato H, Sugihara M, Amatatsu M, Kohno Y. 2005. Tissue choline levels, and an importance of liver choline, glycogen and triglyceride levels in relation to hepatic disorders in dairy cows. *Nihon Chikusan Gakkaiho.* 76(1): 23-28. Doi: <https://doi.org/10.2508/chikusan.76.23>.
- Starke A, Haudum A, Busche R, Beyerbach M, Dänicke S. 2010. Technical note: Analysis of total lipid and triacylglycerol content in small liver biopsy samples in cattle. *J Anim Sci.* 88: 2741–2750. Doi: 10.2527/jas.2009-2599.
- Tedeschi LO, Pell AN, Fox DG, Llamas CR. 2001. The amino acid profiles of the whole plant and of four plant residues from temperate and tropical forages. *J Anim Sci.* 79: 525-532. Doi: 10.2527/2001.792525x.
- Weber C, Hametner A, Tuchscherer B, Losand E, Kanitz W, Otten SP, Singh SP, Bruckmaier RM, Becker F, Kanitz W, Hammon HM. 2013. Variation in fat mobilization during early lactation differently affects feed intake, body condition, and lipid and glucose metabolism in high-yielding dairy cows. *J Dairy Sci.* 96: 165–180. Doi: 10.3168/jds.2012-5574.
- Zom RL, Van Baal J, Goselink RM, Bakker JA, De Veth M, Van Vuuren AM. 2011. Effect of rumen-protected choline on performance, blood metabolites, and hepatic triacylglycerols of periparturient dairy cattle. *J Dairy Sci.* 94: 4016-4027. Doi: 10.3168/jds.2011-4233.

Article citation

Galvis RD, Montoya JA, Madrid LV. 2018. Efecto del nivel de complementación con metionina-colina en vacas Holstein durante el periodo de transición sobre las concentraciones hepáticas de triglicéridos, colina y carnitina. [Effect of the level of complementation with methionine-coline in Holstein cows during the transitional period on the hepatic concentrations of triglycerides, choline and carnitine]. *Rev Med Vet Zoot.* 65(3): 269-281. Doi: 10.15446/rfmvz.v65n3.76464.