

**Efecto de la complementación con Metionina-Colina y L-Carnitina en vacas
Holstein durante el periodo de transición sobre la acumulación hepática de
triglicéridos**

Informe final de tesis

**Doctorado en Ciencias Agropecuarias
Línea de Producción Animal**

Presentado por:

**Rubén Darío Galvis Góez
Zoot. MSc.**

**Orientador:
Ángel Giraldo Mejía. Zoot. Dr.Sc
Profesor asociado
Departamento de Producción Animal**

**Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad Nacional de Colombia
Sede Medellín
2016**

Contenido

Listado de tablas	3
Resumen	5
1. Marco teórico	8
1.1. Periodo de transición a la lactancia.	8
1.2. Metabolismo hepático durante el periodo de transición a la lactancia.	10
1.2.1. Oxidación de ácidos grasos.	12
1.2.2. Esterificación de ácidos grasos y exportación de triglicéridos.	16
3. Planteamiento del problema	20
4. Planteamiento de la hipótesis	23
4.1. Situación 1.	23
4.2. Situación 2.	24
5. Objetivos	25
5.1 Objetivo General	25
5.2. Objetivos Específicos	25
6. Metodología	26
6.1. Localización.	26
6.2. Animales y dieta.	26
6.2.1. Composición química y contenido energético de los suplementos	26
6.2.2. Degradabilidad Ruminal <i>in situ</i> del Reashure® y Aminoshure-M®	29
6.2.3 Degradabilidad del Fumarato de L-Carnitina.	29
6.3. Experimentos	31
6.3.1. Efecto del nivel de complementación con Metionina-Colina	31
6.3.2. Efecto del nivel de complementación con L- Carnitina	32
6.3.3. Efecto del nivel de complementación con diferentes combinaciones de Metionina-Colina y L- Carnitina	33
6.4. Toma de muestras.	34
6.4.1. Sangre periférica	35
6.4.2. Muestras hepáticas	35
6.5. Determinaciones de laboratorio.	35
6.5.1. Determinaciones en sangre.	35
6.5.2. Determinaciones en hígado.	36
6.5.2.1. Obtención del extracto lipídico.	36
6.5.2.2. Determinación de las fracciones lipídicas: triglicéridos, colina-fosfolípidos y ácidos grasos libres.	38
6.5.2.3. Cuantificación de las diferentes formas de Carnitina.	38
6.6. Estimación del Balance Nutricional.	39
6.7. Análisis estadístico.	40
7. Resultados	41
7.1. Experimento 1. Efecto del nivel de complementación con Metionina-Colina	41
7.1.1. Efecto del suministro de colina y metionina sobre las variables determinantes del balance nutricional	41
7.1.2. Efecto del suministro de colina y metionina sobre los indicadores plasmáticos de movilización, oxidación y exportación de lípidos.	43

7.1.3. Efecto del suministro de colina y metionina sobre las concentraciones hepáticas de triglicéridos, colina y carnitina.....	44
7.2. Experimento 2. Efecto del nivel de complementación con Fumarato de L-Carnitina.....	46
7.2.1. Efecto del suministro de Fumarato de L-Carnitina sobre las variables determinantes del balance nutricional	46
7.2.2. Efecto del suministro de Fumarato de L-Carnitina sobre los indicadores plasmáticos de movilización y oxidación lipídica.....	48
7.2.3. Efecto del suministro de Fumarato de L-Carnitina sobre las concentraciones hepáticas de triglicéridos, Acil-Carnitina, Carnitina libre y Carnitina total.....	50
7.3. Experimento 3. Efecto del nivel de complementación con diferentes combinaciones de Metionina-Colina y L-Carnitina	52
7.3.1. Efecto del suministro de diferentes combinaciones de Metionina, Colina y Fumarato de L-Carnitina sobre las variables determinantes del balance nutricional.....	52
7.3.2. Efecto del suministro de diferentes combinaciones de Colina, Metionina y Fumarato de L-Carnitina sobre los indicadores plasmáticos de movilización, oxidación y exportación de lípidos.	54
7.3.3. Efecto de la complementación dietaria con diferentes combinaciones de Metionina, Colina y Fumarato de L Carnitina sobre las concentraciones hepáticas de Triglicéridos, Colina, Acil-Carnitina, Carnitina libre, Carnitina total y Ácidos Grasos Libres (AGL).	55
8. Discusión y Conclusiones	58
8.1.1. Discusión experimento 1. Efecto del nivel de complementación con Metionina y Colina.....	58
8.1.2. Conclusión experimento 1. Efecto del nivel de complementación con Metionina y Colina.....	67
8.2.1. Discusión experimento 2. Efecto del nivel de complementación con Fumarato de L-Carnitina.....	68
8.2.2. Conclusión experimento 2. Efecto del nivel de complementación con Fumarato de L-Carnitina	77
8.3.1. Discusión experimento 3. Efecto de la complementación con diferentes combinaciones de Metionina, Colina y Fumarato de L-carnitina.....	78
8.3.2. Conclusión experimento 3. Efecto de la complementación con diferentes combinaciones de Metionina, Colina y Fumarato de L-Carnitina.	85
9. Conclusión General.....	87
10. Anexos. Medias por periodo de muestreo para cada tratamiento en los tres experimentos.....	88
10.1. Experimento 1. Efecto del nivel de complementación con Metionina y Colina ..	88
10.2. Experimento 2. Efecto del nivel de complementación con Fumarato de L-Carnitina	90
10.3. Experimento 3. Efecto del nivel de complementación con combinaciones de Metionina-Colina y Fumarato de L-Carnitina.....	91
Bibliografía	93

Listado de tablas

	Pag
Tabla 1. Composición química promedio (n=5) del pasto kikuyo (<i>Cenchrus clandestinum</i>) ofrecido a los animales durante el experimento.....	28
Tabla 2. Composición química promedio (n=7) del suplemento alimenticio base utilizado en los experimentos.....	28
Tabla 3. Ingredientes utilizados en la formulación del suplemento alimenticio utilizado en los diferentes experimentos.....	29
Tabla 4. Resumen de los tratamientos en los diferentes experimentos.....	35
Tabla 5. Medias por tratamiento para las variables determinantes del balance nutricional en vacas Holstein sometidas a diferentes niveles de inclusión de Colina y Metionina.....	42
Tabla 6. Medias por periodos de muestreo para las variables determinantes del balance nutricional en vacas Holstein sometidas a diferentes niveles de inclusión de Colina y Metionina.....	43
Tabla 7. Medias por tratamiento de las concentraciones plasmáticas de triglicéridos (TG), ácidos grasos no esterificados (AGNES), β -hidroxibutirato (BHB) en vacas Holstein sometidas a diferentes niveles de inclusión de Colina y Metionina.....	44
Tabla 8. Medias por periodos de muestreo de las concentraciones plasmáticas de TG, AGNES y BHB de vacas Holstein sometidas a diferentes niveles de inclusión de Colina y Metionina.....	45
Tabla 9. 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.....	46
Tabla 10. Medias por periodo de muestreo de las concentraciones hepáticas de triglicéridos, colina y carnitina de vacas Holstein sometidas a diferentes niveles de inclusión Metionina-Colina.....	47

Tabla 11. Medias por tratamiento para las variables determinantes del balance nutricional en vacas Holstein sometidas a diferentes niveles de inclusión de Fumarato de L-Carnitina.....	48
Tabla 12. Medias por periodos de muestreo para las variables determinantes del balance nutricional en vacas Holstein sometidas a diferentes niveles de suplementación con Fumarato de L-Carnitina.....	49
Tabla 13. Medias por tratamiento para las concentraciones plasmáticas de AGNES, β -hidroxibutirato y Urea en vacas Holstein sometidas a diferentes niveles de complementación con Fumarato de L-Carnitina.....	50
Tabla 14. Medias por periodo de muestreo de las concentraciones plasmáticas de AGNES, β -hidroxibutirato, (BHB) glucosa y urea en vacas Holstein suplementadas con Fumarato de L-Carnitina.....	50
Tabla 15. Medias por tratamiento para las concentraciones hepáticas de triglicéridos, acil-carnitina y carnitina total en vacas Holstein sometidas a diferentes niveles de inclusión de Fumarato de L-Carnitina.....	51
Tabla 16. Medias por periodo de muestreo de las concentraciones hepáticas de triglicéridos, y carnitina de vacas Holstein sometidas a diferentes niveles de inclusión Fumarato de L-Carnitina.....	52
Tabla 17. Medias por tratamiento para las variables determinantes del balance nutricional en vacas Holstein sometidas a diferentes combinaciones de Metionina, Colina y Fumarato de L-Carnitina.....	53
Tabla 18. Medias por periodos de muestreo para las variables determinantes del balance nutricional en vacas Holstein sometidas a diferentes combinaciones de Metionina, Colina y Fumarato de L-Carnitina....	54
Tabla 19. Medias por tratamiento de las concentraciones plasmáticas de AGNES, β -Hidroxibutirato y triglicéridos, en vacas Holstein sometidas a complementación con diferentes combinaciones de Metionina, Colina y Fumarato de L- Carnitina.....	55
Tabla 20. Medias por periodo de muestreo de las concentraciones plasmáticas de AGNES, β -Hidroxibutirato (BHB) y triglicéridos en función de los días de muestreo en vacas Holstein complementadas con diferentes combinaciones de Metionina, Colina y Fumarato de L- Carnitina.....	56
Tabla 21. Medias por tratamiento de las concentraciones hepáticas de triglicéridos, colina, carnitina total, carnitina libre, acil-carnitina, carnitina total y ácidos grasos libres (AGL) en vacas Holstein sometidas a diferentes combinaciones de Metionina, Colina y Fumarato de L-Carnitina.....	57
Tabla 22. Medias por periodo de muestreo de las concentraciones hepáticas de triglicéridos, colina, carnitina y ácidos grasos libres (AGL) de vacas Holstein sometidas a diferentes combinaciones de Metionina Colina y Fumarato de L-Carnitina.....	58

Resumen

Con el objetivo de evaluar el potencial lipotrópico de Metionina-Colina y L-Carnitina en vacas lecheras durante el periodo de transición, tres experimentos fueron desarrollados. En el primer experimento se evaluó el efecto de la complementación alimenticia con 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/día. En el segundo experimento se evaluó el efecto de la complementación alimenticia con 100 y 200 g/d de fumarato de L-carnitina. En el tercer experimento se evaluó el efecto de la complementación con una FCPDR de metionina (20g/d) en combinaciones con dosis bajas de una FCPDR de colina (60g/d) y dosis bajas (100 g/d) y altas (200g/d) de fumarato de L-Carnitina; y el efecto de dosis altas de una FCPDR de colina (120g/d) en combinación con dosis bajas (100g/d) y altas (200g/d) de fumarato de L-Carnitina. En cada experimento los tratamientos fueron comparados entre sí y contra un tratamiento control. Las pruebas de degradabilidad ruminal de los compuestos utilizados indicaron tasas de degradabilidad ruminal a 24 horas de 30% para la FCPDR de Metionina, 3.2% FCPDR de colina y 90% para el fumarato de L- carnitina; debido a esto las dosis utilizadas disponibles para su absorción intestinal fueron 10.5 g/d de metionina, 14.5 y 29 g/d de colina, y 5.8 y 11.6 g/d de L-carnitina, respectivamente según la dosis utilizada (baja o alta). La fase experimental se realizó en el centro Paysandú de la Universidad Nacional, sede Medellín, ubicado a 2400 m.s.n.m., con una temperatura promedio de 14°C y humedad relativa promedio del 80%. El estudio se desarrolló con 59 vacas Holstein de dos o más partos pero no más allá de seis. Entre 5 y 7 vacas fueron asignadas a cada tratamiento. Las vacas pastorearon praderas de kikuyo (*Cenchrus clandestinum*) y recibieron un complemento alimenticio, que acorde con el experimento recibía la adición de la respectiva fuente de cada factor lipotrópico, para metionina, Aminoshure-M® (75% L-Metionina, Balchem USA), para colina Reashure-M®, (25% de Colina, Balchem USA) y para Carnitina, Fumarato de L-Carnitina (58%, de L-Carnitina, Suzhou Vitajoy Biotech, Co China). Los animales experimentales recibieron los tratamientos desde el día 260 de gestación y hasta el día 20 posparto. Todos los animales fueron pesados al inicio del experimento y se les calificó la condición corporal. El día 270 de gestación y a los días 10 y 20 posparto se les tomo muestras de sangre y biopsia hepática, se pesaron y se les califico la condición

corporal. En las muestras de hígado se determinaron las concentraciones de triacilglicéridos, de colina, de ácidos grasos libres, de Carnitina total, Carnitina libre y Acil Carnitina. En las muestras de suero se cuantificó Las concentraciones AGNES, β -Hidroxi butirato (BHB), Triglicéridos, Glucosa y Urea. El día 270 de gestación y el día 10 y 20 postparto se estimó el consumo de materia seca, 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). Se realizaron análisis de medidas repetidas en el tiempo. Previamente se modeló la estructura de covarianzas. 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. No se presentaron interacciones entre los tratamientos y los periodos de muestreo para ninguna de las variables analizadas. No se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos para los consumos de materia seca, producción de leche y sus contenidos de grasa y proteína. Durante el preparto se presentaron los valores significativamente más altos ($p < 0.05$) de triglicéridos plasmáticos y urea, y los valores significativamente más bajos ($p < 0.05$) de AGNES y BHB, la causa más probable pudo ser un balance nutricional más favorable, pues durante el preparto se presentaron valores significativamente más altos ($p < 0.05$) en los balances de energía neta de lactancia (ENL), de proteína metabolizable (PM) y de proteína degradable en rumen (PDR). Las concentraciones hepáticas de triglicéridos, de colina y de las diferentes formas de carnitina no difirieron significativamente entre periodos de muestreo. La suplementación con los diferentes factores lipotrópicos y sus combinaciones no afectaron significativamente los valores de AGNES. Las concentraciones plasmáticas de β -hidroxi butirato tendieron a aumentar con la suplementación con L-carnitina, y aumentaron significativamente ($p < 0.05$) con la suplementación conjunta con metionina y colina y con la suplementación conjunta con las dosis mayores de colina y carnitina. La concentración hepática de triglicéridos se encontró en un rango de clasificación bajo, y no se vio afectada por la suplementación con metionina y/o colina, pero si mostró una alta tendencia ($p = 0.077$) a la disminución con la suplementación conjunta con las dosis mayores de colina y carnitina, y mostró una disminución significativa ($p < 0.05$) en respuesta a la suplementación con 200 g/d de

fumarato de L-Carnitina. El aumento en las concentraciones de β -hidroxibutirato en respuesta a la suplementación con colina y/o carnitina indicó que el mecanismo de disminución de triglicéridos hepáticos fue debido posiblemente al aumento de la oxidación de ácidos grasos. La suplementación con L- carnitina aumentó significativamente la síntesis de urea, posiblemente a través de la estimulación del ciclo de la urea a varios niveles, lo cual fue descrito en otras especies, pero aún no ha sido objeto de estudio en rumiantes. Las concentraciones hepáticas de colina y carnitina no se afectaron con la suplementación con metionina y/o colina, por el contrario la complementación conjunta con los tres factores lipotrópicos (metionina, colina y carnitina) aumentó significativamente las concentraciones hepáticas de colina, pero no así las de carnitina, indicando que se presentó una disminución significativa en la utilización de colina en la síntesis de carnitina, debido a una disminución en la síntesis endógena de carnitina en respuesta a la suplementación con carnitina. Bajo concentraciones relativamente bajas de AGNES y triglicéridos hepáticos, la metionina y colina no son nutrientes limitantes para la exportación de triglicéridos desde el hígado a la sangre, por consiguiente bajo esta condición no se observó lipidosis hepática y como consecuencia la suplementación con metionina y/o colina no ocasionó efectos significativos sobre las concentraciones hepáticas de triglicéridos. La suplementación con colina y/o carnitina aumentó significativamente las concentraciones de β -hidroxibutirato, lo que sugiere que la disponibilidad de carnitina o sus precursores son limitantes para la oxidación de ácidos grasos en el hígado de vacas en el periodo de transición. Aun a bajas concentraciones de AGNES y triglicéridos hepáticos el incremento en la oxidación de ácidos grasos inducido por una mayor disponibilidad de carnitina disminuyó significativamente la disponibilidad de ácidos grasos para la formación hepática de triglicéridos.

1. Marco teórico.

En los sistemas especializados en producción lechera ha ocurrido un incremento constante en la producción de leche por vaca. La alta producción origina que algunas funciones hepáticas claves para la adaptación de la vaca periparturienta a las condiciones que impone la lactancia funcionen al máximo. El hígado debe adaptar su funcionamiento para soportar su propio gasto energético, así como para la exportación de sustratos energéticos a los demás tejidos (Drackley *et al*, 2001). Los estudios realizados en el exterior (Greenfield *et al*, 2000; Piepenbrink y Overton, 2003) y en Colombia (Galvis *et al*, 2003) han puesto en evidencia la imposibilidad de las vacas de generar una respuesta metabólica ante las elevadas exigencias que impone el final de la gestación y la iniciación de la lactancia (Webver *et al*, 2013), lo cual en consecuencia ha hecho cada vez más evidente el aumento en la frecuencia e intensidad de los problemas en la salud y en la reproducción, disminución en la vida productiva de los hatos, además de respuestas productivas menores a las esperadas por el potencial genético de las vacas lecheras (Löf *et al*, 2007 Mulligan y Doherty, 2008).

1.1. Periodo de transición a la lactancia.

La importancia del periodo de transición a la lactancia fue resaltada por Gonzales y Koenekan (2006) en los siguientes términos: *“La necesidad de una transición exitosa desde las etapas finales de la preñez hasta la consolidación de la lactancia ha tomado fuerza durante la última década en la medida que investigadores y especialistas en manejo de vacas lecheras de alta producción han reconocido la importancia de este periodo. Esta etapa de transición se caracteriza por cambios dramáticos en la demanda de nutrientes, lo que requiere de una coordinación muy precisa del metabolismo para satisfacer las demandas de glucosa, aminoácidos y ácidos grasos. En general, estas alteraciones son un reflejo de los cambios hormonales que ocurren para facilitar el proceso del parto y la preparación de la glándula mamaria para la síntesis de leche”*.

En las semanas previas al parto se presenta una disminución en el consumo de materia seca (Vazquez-Añon *et al*, 1994) y un aumento en las necesidades nutricionales

ocasionadas por la demanda impuesta por el desarrollo fetal; estas situaciones originan un balance energético negativo (BEN) el cual desencadena una intensa lipólisis y transporte de los ácidos grasos no esterificados (AGNES) hacia el hígado, lo cual está estrechamente relacionado con las alteraciones de la salud que caracterizan el periodo de transición a la lactancia (Dyk *et al*, 1995). No debe perderse de vista que el hígado recibe y coordina el flujo de aminoácidos (AA), glucosa y ácidos grasos (AG) necesarios para satisfacer las demandas crecientes en la preñez tardía y en la iniciación de la lactancia (Bauman y Currie, 1980).

Reynolds *et al* (2000a) determinaron que en las vacas el día 10 posparto aumentó en 44% el consumo de materia seca, mientras que los mismos investigadores señalaron que en el hígado el consumo de oxígeno lo hacía en un 95% (Reynolds *et al*, 2000b). Esta relación de incremento entre el consumo de materia seca y de oxígeno pone de manifiesto que durante el periodo de transición a la lactancia el hígado se expone a un aumento importante en el gasto energético y a un déficit de nutrientes. En lo que concierne a la glándula mamaria para la misma etapa Bell (1995) estableció aumento en las demandas de los AG en alrededor de 500%, de glucosa en 250% y 200% en los AA.

Lomax *et al* (1979) identificaron que en las primeras semanas posparto disminuye significativamente la insulina plasmática debido al BEN y por una posible disminución en la respuesta pancreática a los estímulos insulíntricos. Esta disminución en la insulina plasmática promueve un estado de lipólisis, contrario a la lipogénesis, que se espera se debería desencadenar por la insulina. Diversos autores experimentaron con dietas altas en carbohidratos solubles para evaluar el efecto sobre la secreción de insulina y la disminución de la lipólisis, encontrando efectos positivos pero no suficientes para disminuir significativamente la sobrecarga de AG en el hígado (Dann *et al*, 1999; Minor *et al*, 1998; Van de Haar *et al*, 1999). Esto debido posiblemente a una disminución en la sensibilidad de los tejidos a la insulina (Herdt, 2000).

1.2. Metabolismo hepático durante el periodo de transición a la lactancia.

El hígado utiliza los AG mayoritariamente como fuente energética; los excedentes que no realizan oxidación mitocondrial deben ser esterificados e integrados a la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) 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 la VLDL) pueden estar disminuidos debido a la baja disponibilidad de componentes claves como la metionina, colina y carnitina (Drackley *et al*, 2001; Piepenbrink y Overton, 2003; Piepenbrink *et al*, 2004).

Considerando la importante función que tiene el hígado como proveedor de glucosa a los demás tejidos es necesario resaltar las vías alternas a la oxidación de glucosa por las cuales este obtiene su propio suministro energético y conocer los puntos limitantes para la utilización de los AG por el tejido hepático. Las estimaciones realizadas por Drackley *et al* (2001) a partir de la utilización de los AGNES reportada por Reynolds *et al* (1988) y el modelo propuesto por Pullen *et al* (1989), indicaron que el hígado de las vacas al inicio de la lactancia temprana capta cerca del 25% del total de los AGNES circulantes, lo cual a juicio de Reynolds *et al* (1988) debería contribuir hasta con el 60% de los substratos oxidados para la producción de ATP. Este valor es similar al flujo de sangre hacia el hígado, por lo que Huntington (1990), afirmó que con respecto a los demás tejidos en el hígado no existe una utilización mayoritaria de los AGNES.

Durante el periodo de transición a la lactancia la cantidad de AGNES que llega al hígado sobrepasa su capacidad de oxidación. Según González *et al* (2011) la intensa lipólisis que ocurre durante este periodo eleva los AGNES a concentraciones superiores a 0.5 mM. Gonzalez y Koenekan (2006) utilizaron los registros de captación hepática de AGNES reportados por Pullen *et al* (1989) y el gasto energético por el tejido hepático reportado por Reynolds *et al* (1988) para estimar la cantidad de AGNES captada y oxidada o esterificada por el hígado de vacas en lactancia temprana. Con base en esta información estimaron que las vacas con concentración de AGNES de 1 mM deberían tener una captación hepática de AGNES cercana a 928 g/d (140 mmol/h) de los cuales solo serían

necesarios 403 g/d para satisfacer las necesidades energéticas. El remanente de 525 g/día de AGNES que queda en el hígado debe ser esterificado para ser exportado a los tejidos extra hepáticos. Esta información pone de manifiesto que las concentraciones de AGNES superiores a 0.5 mM probablemente conducen a desbalances entre la captación y la oxidación de AGNES por el tejido hepático, lo que probablemente incrementa el riesgo de infiltración grasa. Al respecto González *et al* (2011) reportaron un coeficiente de correlación significativo entre los valores de AGNES superiores a 0.4 mM y la alteración en la AST como indicador de lipidosis hepática. Por su parte Pullen, Palmquist y Emery (1989) establecieron una correlación negativa entre la concentración plasmática de AGNES y el porcentaje de AGNES incorporados a triglicéridos hepáticos, sugiriendo que un incremento en los AGNES no origina un incremento proporcional en los sustratos para la síntesis de triglicéridos y su secreción. Estos autores concluyeron que la intensa lipólisis que se presenta en el posparto parece inducir diferentes grados de infiltración grasa en el hígado y citaron que en los casos en los que se presentan las formas severas existe una asociación con la disminución en la exportación de triglicéridos (Herdt *et al*, 1983).

El principal mecanismo de regulación del metabolismo de los AGNES en el hígado consiste en el suministro de AGNES al hígado (Hocquette y Bauchart 1999). Lo anterior debido a la relación directa entre la captación hepática de AGNES y la lipólisis del tejido adiposo mediada por la lipasa sensible a hormonas. Una vez en la célula hepática la insulina estimula la esterificación de los AG (Zammit, 1996). Para Chow y Jesse (1992) el principal papel de la insulina en el metabolismo de los AG radica en su efecto sobre la actividad de la CPT-1, la cual disminuye con el aumento en el nivel de la hormona. Esta observación es consistente con los resultados de Al-Trad *et al* (2010), quienes establecieron que la CPT-1 hepática se inhibía como respuesta a la infusión intravenosa de glucosa en vacas lactantes. Por su parte Hippen *et al* (1999) reportaron que la aplicación de glucagón, por su efecto antagónico a la insulina, promueve la utilización de los triglicéridos hepáticos, posiblemente a través de un incremento en la oxidación de los AG. Se conoce que el metabolismo de los AG está coordinado con la disponibilidad de glucosa y los sustratos gluconeogénicos: la disminución en la oxidación de los AG es el resultado del aumento en los niveles de propionato (Emery *et al*, 1992; Grummer, 1993).

Chow y Jesse (1992) afirmaron que la gluconeogénesis a partir de propionato, lactato ó piruvato requiere de la oxidación de AG para el suministro de los ATP requeridos en el proceso; por lo tanto ambos procesos ocurren simultáneamente en el hígado de las vacas lecheras. Al respecto Drackley *et al* (1991a) reportaron que los sustratos gluconeogénicos como alanina, piruvato y lactato estimulan la oxidación de los AG.

1.2.1. Oxidación de ácidos grasos.

Basados en la información de Drackley *et al* (1991b) referida a la captación y oxidación de AG durante el periodo de transición a la lactancia, se surge que las vacas lecheras modifican significativamente la oxidación de los AG captados más no su captación. Dichos investigadores determinaron que mientras que la oxidación del palmitato aumentó (23,6% en vacas secas y 40,7% en lactancia temprana) de manera inversa con el balance nutricional (BN), su captación disminuyó en 13%. Estos resultados ponen de manifiesto la existencia de un excedente de AG significativamente mayor en las vacas secas, lo que según los autores condujo a mayor esterificación (76,2%) en éstas que en las vacas en lactancia (59,3%). Por consiguiente es probable que en el parto se incremente de manera significativa la acumulación triglicéridos hepáticos, disminuya en magnitud en el posparto temprano cuando cae marcadamente el balance energético originando un incremento en la oxidación de los AG.

El aumento en la oxidación de los AG requiere la coordinación de diferentes mecanismos entre los que se destaca la actividad de la carnitina palmitoil transferasa- I (CPT-1), la cual se incrementa en 49% el día uno parto (Dann *et al*, 1999). Este aumento exige el aumento proporcional en los sustratos (AG y la carnitina) de la enzima. Según Bell *et al* (2000) el aumento en la movilización de las reservas proteicas suministraría los precursores necesarios para la síntesis de carnitina. Bajo las condiciones nutricionales prevalentes en los sistemas de producción de leche en el trópico alto colombiano es probable que los déficit energéticos pronunciados que se observan durante este periodo obliguen a las vacas a una amplia utilización de AA como fuente energética, restando incluso la posibilidad de garantizar el suministro de lisina y metionina como sustratos para la síntesis de carnitina. Al respecto Galvis *et al* (2003) reportaron para las dos primeras

semanas posparto un BEN hasta del 35%. En un trabajo posterior Galvis *et al* (2010) encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre el BEN y las concentraciones hepáticas de amonio, y entre las concentraciones hepáticas de amonio y piruvato en vacas en el primer tercio de lactancia, lo que sugiere una amplia utilización de los AA de las reservas corporales como fuente de energía.

Una de las adaptaciones importantes al BEN que se presenta en el periodo de transición a la lactancia lo constituye el aumento en la oxidación mitocondrial de los AG. Al respecto Knapp y Baldwin (1990) mencionaron el papel principal de la actividad de la CPT-1 en el control de ingreso de los AG a la mitocondria, modulado por los cambios en las concentraciones del malonil-coa, lo que entrega información importante del balance energético ya que esta aumenta con los incrementos en la concentración de insulina (Zammit 1996; 1999). Lo anterior señala la importancia del funcionamiento adecuado de la CPT-1 para la utilización adecuada de los AGNES como fuente de energía; este señalamiento pone de manifiesto que el déficit de carnitina o de sus precursores esenciales (metionina y lisina) traería como consecuencia una importante disminución en la capacidad de oxidación de los AGNES movilizados hacia el hígado.

Durante el periodo de transición a la lactancia el aumento en el ingreso de los AG a la mitocondria debe conducir al aumento en su β -oxidación, con el consecuente incremento en las concentraciones matriciales de Acetil-CoA cuyos carbonos estarían disponibles para ser oxidados en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y de esta manera se debería incrementar el aporte energético al tejido hepático; sin embargo, no toda la Acetil-CoA continúa hacia el ciclo de los ácidos tricarboxílicos en virtud que durante el periodo de transición a la lactancia la baja disponibilidad de precursores gluconeogénicos crea una situación deficitaria en carbón anaplerótico, lo cual conllevaría a una disminución en la concentración de Succinil-CoA lo que impide mantener la succinilación mecanismo que inactiva la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintetasa (HMG-CoA sintetasa), razones que conducen a que una parte importante de la Acetil-Coa se convierta en sustrato que estaría siendo desviado a la producción de cuerpos cetónicos (Zammit, 1990).

Otro factor importante para la adecuada utilización de los AG por el tejido hepático lo constituye el suministro de piruvato. El aumento en la concentración de Acetil-CoA producto de la β -oxidación provoca la activación de la piruvato carboxilasa responsable de la carboxilación del piruvato hasta oxaloacetato (Chow y Jesse, 1992) necesario para unirse con el exceso de Acetil-CoA formando citrato e iniciando el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Sin embargo cabe advertir que bajo una condición de extensa B-Oxidación aumenta considerablemente la relación NADH/NAD inhibiendo la actividad de las deshidrogenasas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Hegardt, 1999), lo que definitivamente disminuiría la utilización de Acetil-CoA como fuente de energía para el hígado, desviando parte de sus carbonos hacia la síntesis de cuerpos cetónicos.

Una utilización alternativa de los AG en el hígado es la oxidación perosixomal. Piot *et al* (1998) registraron que en el hígado de diversas especies que no existen diferencias proporcionales entre la utilización de AG por la β -oxidación mitocondrial y la oxidación perosixomal. Los resultados de varios investigadores sugieren que la oxidación peroxisomal de los AG aumenta acorde con la abundancia de los AGNES en el tejido hepático. Grum *et al* (1996) por ejemplo informaron el aumento significativo en esta oxidación el día del parto cuando se comparó con el inicio de la etapa de transición a la lactancia y además indicaron que en este período las vacas alimentadas con dietas altas en grasa (alrededor del 50% de su composición era de ácidos grasos insaturados, de los cuales el 10% era poliinsaturados) en comparación con aquellas que recibieron la dieta control o altas en granos presentaron aumento significativo en la oxidación peroxisomal.

En la evaluación del efecto de la grasa de la dieta sobre la oxidación perosixomal es importante considerar la composición de los AG. En un trabajo realizado por Petit *et al* (2007) suministraron durante cuatro semanas preparto y cuatro posparto dietas con grasas saturadas e insaturadas. Las evaluaciones realizadas mostraron que las vacas que recibieron grasas saturadas tuvieron mayores niveles de AGNES en sangre, de lípidos totales y de triacilglicéridos hepáticos que las vacas control y las que se suplementaron con aceite de linaza (*Linum usitatissimum*), pero no hubo diferencia entre las vacas del grupo control y las que recibieron el suplementado con aceite de linaza con

respecto a la concentración de triacilglicéridos hepáticos. La posible explicación de este resultado radicaría en el nivel de ácidos grasos poliinsaturados de las dietas: mientras que en las dietas de las vacas suplementadas con grasas saturadas el porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados fue cercano a 32, en las que conformaron el grupo control y las de linaza este porcentaje no estuvo distante (59 y 67% respectivamente). Mientras estos investigadores resaltan que existe efecto negativo de las grasas saturadas sobre la lipidosis hepática, Grum *et al* (1996) afirmaron que la complementación con grasas saturadas estimula la oxidación peroxisomal. Esta discrepancia en los enfoques y resultados muestra que es limitada la información disponible sobre los mecanismos por los cuales se logra una efectiva estimulación de la oxidación peroxisomal y, como lo afirmaron Douglas *et al* (1998) su conocimiento tiene utilidad potencial para incrementar la utilización de los AGNES por hígado ya que es una vía alterna que no está sujeta a la regulación por parte de la CPT-1.

Como se mencionó la regulación de la B-oxidación mitocondrial está dada por el control de la actividad de la CPT-1, la cual es sensible a la cantidad de energía requerida por la célula. Se sabe que las vacas durante el periodo de transición presentan condiciones deficitarias en nutrientes y energía limitaciones en metionina y la lisina, aminoácidos precursores de la carnitina, es pertinente pensar que la disponibilidad de esta puede constituirse en factor limitante para la actividad de la CPT-1. Drackley *et al* (1991a) indicaron que en condiciones *in vitro* cuando los hepatocitos se suplementaron con carnitina hubo aumento de la oxidación del palmitato, la cual resultó anulada cuando se adicionó un inhibidor de la CPT-1, demostrándose la sensibilidad de la CPT-1 a la disponibilidad de carnitina y sugiriendo que puede ser posible la modulación de la actividad de esta enzima con la complementación con carnitina. En el trabajo de Lacount *et al* (1995) se evidenció que si bien hubo respuesta en las concentraciones de carnitina en sangre e hígado cuando esta fue infundida a razón de 6 g diarios dichos investigadores no identificaron respuesta en los indicadores de lipidosis hepática.

1.2.2. Esterificación de ácidos grasos y exportación de triglicéridos.

La alta movilización de los AGNES hacia el hígado y su capacidad limitada de oxidación en la vaca en la fase de transición hacia la lactancia originan AG en exceso los cuales deben ser esterificados a triacilglicéridos con el resultante incremento de la lipidosis hepática. Grum *et al* (1996) reportaron que la esterificación del palmitato en el tejido hepático se incrementó de 110 a 220 mmol/hora/g de tejido húmedo entre la tercera semana preparto y la primera semana posparto, el cual fue relacionado de manera directa con el nivel de los triacilglicéridos hepáticos. Al respecto Van Den Top *et al* (1995) atribuyeron el aumento en la concentración hepática de triacilglicéridos al incremento en la captación hepática de AGNES utilizados para la síntesis de triacilglicéridos debido al aumento significativo en la actividad de la diacilglicerol aciltransferasa al pasar entre la semana dos preparto y la semana posterior al parto de 0,4 a 1,0 mmol/min/mg de proteína. De este modo durante la fase de transición el hígado de la vaca se enfrenta al aumento en la cantidad de triacilglicéridos que se deben exportar a los de más tejidos. Kleppe *et al* (1988) concluyeron que no existen diferencias en la capacidad de esterificación en el hígado de rumiantes y monogástricos; no obstante en los rumiantes es limitada la capacidad de incorporación de los triacilglicéridos en moléculas de VLDL (Graulet *et al*, 1988; Pullen *et al*, 1989). Como en el rumiante la exportación de VLDL no se corresponde con la síntesis de triacilglicéridos se ocasiona la lipidosis hepática. La formación de VLDL en el hígado de la vaca es demandante de varios componentes limitantes: fosfolípidos, colesterol y apoproteínas. Para Bauchart (1993) los componentes más limitantes pueden ser la apoproteína B-100 (ApoB-100) y la fosfatidilcolina. Vance (1990) indicó que en el retículo endoplasmico una proteína microsomal (MTP) transfiere de manera cotranslacional los triacilglicéridos a la ApoB-100. Gruffat-Mouty *et al* (1999) señalaron la existencia de una baja actividad de la MTP en rumiantes, situación diferente a la registrada por Breemer *et al* (1999) y por Breemer *et al* (2000) quienes encontraron una actividad significativa de MPT en vacas sin que esta actividad se haya correlacionado con la lipidosis hepática. Bauchart *et al* (1996) indicaron que en el citosol los triacilglicéridos *de novo* deben sufrir hidrólisis previa para poder ingresar a los microsomas y servir como componente de la molécula de VLDL, situación que fue cuestionada por Zammit (1996;

1999) al argumentar que solo una pequeña cantidad de los triacilglicéridos de *síntesis de novo* en los microsomas son incorporados en la molécula de VLDL. En el tema que sí parece existir acuerdo desde los años 90 es en el hecho según el cual la cantidad de triacilglicéridos microsomales disponibles guarda relación directa con la lipogénesis (Emery *et al*, 1992; Grummer 1993), la cual se conoce se encuentra disminuida en el periodo de transición a la lactancia.

La función más importante de la ApoB-100 consiste en la estabilización de la partícula de VLDL (Gibbons 1990), lo que coloca de manifiesto su importancia en la exportación de lípidos desde el hígado. Gruffat *et al* (1997) establecieron esta importancia al encontrar una relación negativa entre los niveles de Apo B-100 en sangre y tejido hepático con la lipidosis hepática. En nuestras condiciones de producción si bien se carece de estudios que demuestren de forma directa el grado de lipidosis y su asociación con la molécula de VLDL, existe información que registra la elevación en los niveles de los AGNES como indicadores de movilización lipídica asociada con la elevación en la actividad de la aspartato transaminasa (AST) (Galvis *et al*, 2003), actividad que según González *et al* (2011) puede considerarse indicadora confiable de lipidosis hepática. En las condiciones colombianas de producción especializada con bovinos de leche Galvis *et al* (2007) establecieron que en el plasma de la sangre de vacas Holstein en los primeros 50 días de lactancia se presentaron incrementos significativos en las lipoproteína de alta (HDL) y baja densidad (LDL) pero no en la VLDL y los triacilglicéridos, sugiriendo la imposibilidad de las vacas de adaptar la exportación de los triacilglicéridos hepáticos a la demanda de este periodo.

La presencia de cantidades suficientes de Apo B-100 no garantiza necesariamente el ensamblaje de la partícula de VLDL (Marcos *et al*, 1990). En un trabajo realizado en ratones deficientes en colina y suplementados con metionina con el fin de evaluar su efecto sobre la exportación de triacilglicéridos, Yao y Vance (1988) establecieron el aumento en la formación de partículas de VLDL, hallazgo que fue atribuido al aumento en la disponibilidad de fosfatidilcolina que es necesaria para su ensamblaje y explicado por el efecto positivo que tiene la metionina como donadora de grupos metilos necesarios

para la formación de fosfatidilcolina a partir de la fosfatidil etanolamina. Parece ser que en rumiantes este mecanismo es de igual importancia: Emmanuel y Kennedy (1984) registraron que cuando a cabras lactantes se les administró L-Metyl-¹⁴C Metionina el 28% de la colina resultó marcada. Según Vermeulen *et al* (1997) la fosfatidilcolina juega un papel fundamental en la estabilización de los lípidos neutros en el núcleo de la partícula de VLDL.

Piepenbrink y Overton (2003) indicaron que la disponibilidad de fosfatidilcolina puede ser un factor limitante en el hígado de las vacas en la lactancia temprana debido a la depresión en el consumo de materia seca la que limitaría la ingestión adecuada de nutrientes, entre los que se destacan sus precursores colina y metionina. Al respecto Bauchardt *et al* (1996) y Durand *et al* (1992) indicaron que la complementación con lisina y metionina a vacas recién paridas disminuyó la concentración de triacilglicéridos e incrementó las concentraciones de ApoB-100 y VLDL en el hígado, pero no se encontraron cambios en los triacilglicéridos y ApoB-100 hepáticos cuando las vacas fueron suplementadas con metionina, lo que sugiere que la lisina cumple un importante papel en la síntesis de ApoB-100 y en la disminución en la cantidad de AG para la esterificación debido a un aumento en su utilización alterna por la CPT-1 y su posterior oxidación.

Rulquin *et al* (1993) y Schwab (1996) afirmaron que los requerimientos de metionina de las vacas en lactancia temprana no son cubiertos por las dietas a base de maíz comúnmente utilizadas. Por su parte Chalupa y Sniffen (1991) señalaron que muchos de los AA de la dieta son degradados por la flora microbiana en el rumen. En el caso de la metionina Velle *et al* (1997) establecieron que su tasa de degradación ruminal era cercana al 88%, razones que permiten establecer que las formas de AA no protegidas de la degradación ruminal originarían escasas respuestas metabólicas y productivas.

La complementación con hidroxianálogos de la metionina (MHA) pretende aumentar la disponibilidad de metionina para los procesos metabólicos, especialmente los hepáticos; no obstante, Wester *et al* (2000a, 2000b) sugirieron que estos son utilizados en buena medida por los tejidos extra hepáticos, lo que coincide con los resultados de Bertics y Grummer (1999) quienes no encontraron respuesta en la disminución de los

triacilglicéridos hepáticos en vacas suplementadas con MHA y sometidas a la inducción de lipidosis hepática. De igual forma Johnson *et al* (1999) no encontraron elevación en la concentración de metionina plasmática ni en la proteína de la leche cuando suplementaron vacas con MHA.

2. Justificación

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; ésta ha llegado a abastecer el mercado nacional y cada vez genera más excedentes para la exportación (Fedegan, 2012). El incremento sostenido en la producción de leche ha traído como consecuencia un aumento en la incidencia de alteraciones metabólicas (Ceballos *et al*, 2002), la mayoría asociadas con la movilización de las reservas corporales durante la lactancia temprana. Varios investigadores (Galvis *et al* 2003; Gaviria *et al*, 1999) han sugerido que bajo nuestras condiciones de producción la lipidosis hepática podría ser una condición frecuente que puede ser el origen de otras alteraciones propias de las vacas en la lactancia temprana. Sin embargo no se tienen reportes acerca de las concentraciones hepáticas de triglicéridos bajo nuestras condiciones de producción.

Las estrategias para mejorar la condición metabólica de las vacas en la lactancia temprana deberán aumentar la utilización de las grasas por el tejido hepático y el transporte de los lípidos desde el hígado a los demás tejidos. La aproximación práctica de estas estrategias se enfrenta a dificultades al carecer de información sobre el suministro eficaz de factores lipotrópicos, lo cual justifica la realización de investigaciones que permitan el desarrollo de protocolos eficaces bajo las condiciones propias de los sistemas de producción de leche.

En estudios previos se ha establecido que la L-carnitina y la colina presentan potencial importante como factores lipotrópicos; si bien el alcance de estas investigaciones ha sido limitado han permitido identificar que es posible modular el metabolismo de los AG en el

hígado a través del suministro de estos factores lipotrópicos. La utilización de estos factores lipotrópicos no ha sido evaluada bajo condiciones de pastoreo. Un elemento adicional que debe ser atendido en los alcances de estas investigaciones está relacionado con aspectos tales como los niveles, forma y frecuencia de suministro los cuales aún no se encuentran claramente establecidos.

Con el desarrollo de este proyecto se pretende establecer lineamientos para el suministro eficaz de factores lipotrópicos bajo las condiciones de producción del trópico alto, colombiano, con el objetivo de disminuir las alteraciones metabólicas asociadas con la movilización de reservas corporales durante el periodo de transición y la lactancia temprana.

3. . Planteamiento del problema

En las últimas tres semanas preparto las vacas lecheras reducen el consumo de alimento, movilizan los AGNES y disminuye la síntesis de fosfatidil colina ocasionada por la disminución en el consumo de sus precursores (Piepenbrink y Overton, 2003). En estas condiciones el hígado recibe gran cantidad de los AGNES movilizados los cuales deben ser oxidados para su propio gasto energético o hacia el transporte de triacilglicéridos en la molécula de VLDL hacia el resto de los tejidos. Estos procesos no se realizan a la velocidad adecuada durante el periparto lo que conduce a diferentes niveles de lipidosis hepática (Drackley *et al*, 2001), disminución en la respuesta inmune, en la fertilidad y en la capacidad productiva de las vacas en la lactancia temprana (Geelen y Wensing, 2006).

Ha originado elevado interés el conocimiento de los mecanismos responsables de la lipidosis hepática desde varias direcciones: la identificación de los sitios potenciales para la modulación nutricional del metabolismo de los AGNES en el hígado, la determinación de la sensibilidad del transporte de lo AGNES hacia la mitocondria con respecto al suministro de carnitina (Carlson *et al*, 2007a) y la evaluación de sí el ensamblaje de la molécula de VLDL es sensible al suministro de metionina y colina (Yao y Vance, 1988).

Pinotti *et al* (2005), revisaron los resultados de muchas de las investigaciones realizadas entre 1991 y 2004 y concluyeron que el rango de complementación con 12 a 20 gramos

por día de colina que escapa a la degradación ruminal (CEDR) sería suficiente para vacas peri parturientas alimentadas con base en ensilaje de maíz. Esta información fue corroborada por Cooke *et al* (2007) en vacas con lipidosis hepática inducida y por Zom *et al* (2011), quienes encontraron una disminución en los triglicéridos hepáticos en respuesta a la suplementación de 15 y 14.4 gramos por día respectivamente de CEDR. Sin embargo Hartwell *et al* (2000) y Piepenbrink y Overton (2003), no reportaron efecto significativo en la disminución de los triglicéridos hepáticos cuando suministraron 6 y 12 gramos de CEDR y 11.25, 15 y 18.75 gramos de CEDR respectivamente. Hartwell *et al* (2000) indicaron que la disponibilidad de los precursores para la síntesis de colina en el hígado de vacas durante la gestación tardía y la lactancia temprana puede limitar la eficacia de la complementación con colina; por su parte Piepenbrink y Overton (2003) atribuyeron la no respuesta en la disminución de triglicéridos hepáticos a la complementación con CEDR a la menor concentración energética de la dieta utilizada (1,64 Mcal ENI /kg) en comparación con la de estudios previos que si obtuvieron respuestas positivas.

Otro factor importante para la eficacia de la suplementación con colina es el nivel de metionina en la dieta, en el trabajo de Zom *et al* (2011), destaca que el nivel de metionina fue de 2.1% de la proteína digestible intestinal, similar a las recomendaciones de Rulquin *et al* (2001) y a los autores revisados por NRC (2001). Las dietas basadas en maíz, maíz ensilado y derivados del maíz son relativamente altas en metionina ya que la proteína de maíz tiene un contenido alto de metionina en contraste con las dietas a base de forrajes de relativo bajo valor proteico y energético como lo son las empleadas en este estudio. Para el pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinum*), Correa (2006) basado en los resultados de Clark *et al* (1992), reportó que los aminoácidos esenciales con menor concentración relativa en el pasto kikuyo son en su orden lisina y metionina. Posteriormente Correa *et al* (2008) basados en el trabajo de Tedeschi *et al* (2001) sugieren que 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; basado en lo anterior es de esperar un muy bajo aporte de los aminoácidos lisina y metionina para la absorción intestinal en dietas basadas en pasto kikuyo.

Un componente muy importante de la proteína digestible intestinal lo constituye la proteína microbiana, los modelos actualmente utilizados para su estimación arrojan que en condiciones ideales la proteína microbiana constituye entre el 55 al 60% de la proteína metabolizable (NRC, 2001); para alcanzar este resultado el consumo total de energía de la ración debe ser igual o superior a los requerimientos; situación difícil de alcanzar con dietas basadas en pasto kikuyo, dado que autores como Soto *et al* (2005) reportaron valores entre 1.04 y 1.1 Mcal de ENI/kg de MS, cuando las recomendaciones para vacas en lactancia temprana son de 2.05 Mcal de ENI/kg de MS (NRC, 2001). Esta baja valoración energética del pasto kikuyo impide alcanzar el requerimiento energético aun suplementando los animales con los alimentos de más alta concentración energética disponibles. Una característica química del pasto kikuyo que limita de forma importante su valoración energética es su reducido contenido de carbohidratos no estructurales (CNE). Correa *et al* (2008) afirman que los CNE son necesarios para un óptimo crecimiento microbiano. Sin embargo, en el pasto kikuyo la relación CNE: Proteína Degradable en Rumen es muy baja, con un promedio de 1.28 g/g, y concluye que esta baja relación es responsable de la menor síntesis de proteína microbiana estimada para vacas Holstein alimentadas con pasto kikuyo.

Las condiciones nutricionales que subyacen en las dietas basadas en pasto kikuyo coinciden con los factores que autores como Hartwell *et al* (2000) y Piepenbrink y Overton (2003) identificaron como limitantes para el uso eficaz de la colina en la disminución de la lipidosis hepática; por esta razón las dosis propuestas de colina protegida de la degradación ruminal en esta investigación son de 15 y 30 g/día, dosis superiores a las reportadas previamente. Adicionalmente se utilizará una complementación con 15 g de metionina protegida de la degradación ruminal que se postula garantice la eficacia de la complementación con colina. Estos niveles de colina y metionina se estima se logren con 60 y 120 gramos de una fuente comercial de colina protegida de la degradación ruminal y con 20 gramos de una fuente comercial de L- Metionina protegida de la degradación ruminal.

Respecto a la suplementación con carnitina, Carlson *et al* (2006) suministraron 20 g/día de carnitina a través de infusión abomasal a vacas peri parturientas con restricción alimenticia, encontrando que la infusión de carnitina incremento la concentración total de carnitina en hígado y previno la acumulación de triglicéridos hepáticos. Acorde con Lacount *et al* (1995) y Carlson *et al* (2007a) bajas dosis dietarias de carnitina (6 g de carnitina que escapa a la degradación ruminal por día) no son efectivas para elevar la concentración de carnitina en el hígado y disminuir los sustancialmente los triglicéridos hepáticos; Carlson *et al* (2007a) confirmaron que la suplementación con carnitina fue efectiva para estos fines cuando el estimado de carnitina que escapó a la degradación ruminal osciló entre 10 y 20 gramos por día. Con estos precedentes las dosis a utilizar de carnitina que escape a la degradación ruminal en la presente investigación se estima serán de 6 y 12 gramos por día; lo cual se logrará con el suministro de 100 y 200 gramos de fumarato de carnitina respectivamente.

4. Planteamiento de la hipótesis.

4.1. Situación 1.

La reducción en el consumo de materia seca durante el periodo de transición conduce a la reducción significativa en la disponibilidad de nutrientes entre los que se destacan la metionina y la colina considerados como los factores lipotrópicos más limitantes durante este periodo pues juegan papel importante en la síntesis y ensamblaje de las moléculas transportadoras de lípidos. Considerando adicionalmente que la disponibilidad de ambos compuestos esta interrelacionada a través de su papel compartido como donantes de grupos metilo.

El uso de la combinación metionina-colina en las vacas en transición deberá incrementar el nivel de las moléculas plasmáticas transportadoras de lípidos. Se postula como hipótesis que bajo esta situación se podría incrementar la capacidad exportadora de triglicéridos desde el hígado hacia otros tejidos si se complementan las vacas durante el periodo de transición con bajos niveles de metionina y colina conjuntamente, o si se complementan con niveles altos de colina.

4.2. Situación 2.

La baja disponibilidad de metionina y lisina durante el periodo de transición puede limitar la síntesis de carnitina, con lo cual se disminuye la capacidad de oxidación de ácidos grasos por el tejido hepático, incrementando la cantidad de ácidos grasos que deben ser esterificados y potencialmente acumulados en el hígado. Ante el déficit general de aminoácidos que se presenta, su complementación no necesariamente se destinaría a la síntesis de carnitina.

Para esta situación se plantea que la complementación con L-carnitina de las vacas en transición sería eficaz en la estimulación de la oxidación de los ácidos grasos en el tejido hepático.

En ambas situaciones el uso de metionina-colina como de L-carnitina en el suplemento de las vacas en transición deberá disminuir la concentración de los triacilglicéridos hepáticos, disminución que deberá estar asociada con el aumento en la concentración de la colina asociada a los fosfolípidos hepáticos en el primer caso y con el aumento de la L-carnitina en el hígado cuando se utilice el Fumarato de L-carnitina.

5. Objetivos

5.1 Objetivo General

Evaluar el potencial lipotrópico de Metionina-Colina y L-Carnitina en vacas lecheras durante el periodo de transición.

5.2. Objetivos Específicos

1. Evaluar el efecto del nivel de complementación dietaria con Metionina-Colina sobre la concentración de triacilglicéridos hepáticos, la colina presente en los fosfolípidos hepáticos y los niveles plasmáticos de AGNES, β -hidroxibutirato y triglicéridos
2. Evaluar el efecto del nivel de complementación dietaria con L- Carnitina sobre la concentración de triacilglicéridos y L -Carnitina en tejido hepático y los niveles plasmáticos de AGNES y β -hidroxibutirato.
3. Evaluar el efecto del nivel de complementación dietaria con diferentes combinaciones de Metionina-Colina y L- Carnitina sobre la concentración de triacilglicéridos, la Colina presente en la fracción fosfolípidos y la L-Carnitina en tejido hepático y las concentraciones plasmáticas de triglicéridos, AGNES y β -hidroxibutirato.

6. Metodología

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. El proyecto fue financiado por la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, y por COLCIENCIAS en su convocatoria 521 de 2011.

6.1. Localización.

La fase experimental del estudio se realizó en el centro Paysandú de la Universidad Nacional, sede Medellín, ubicado a 2400 m.s.n.m., con una temperatura promedio de 14°C y humedad relativa promedio del 80%, características que corresponden a la formación bmh-MB, según la clasificación de Holdridge (Espinal, 1977).

6.2. Animales y dieta.

En el estudio se desarrollaron tres experimentos con vacas Holstein de dos o más partos pero no más allá de seis, que se encontraban entre el día 260 de gestación y el 20 posparto. Las vacas pastorearon praderas de kikuyo (*Cenchrus clandestinum*) y recibieron un complemento alimenticio ofrecido a razón de 2 kg diarios durante el preparto. Luego del parto las vacas recibieron 6 kg de complemento por día conteniendo los factores lipotrópicos a evaluar de acuerdo con el tratamiento asignado, después del tercer día posparto diariamente se registró la producción de leche. Cuando la producción de leche fue superior a 24 litros, se suministró proporcionalmente 1 kilogramo adicional de complemento base sin factores lipotrópicos por cada cuatro litros de leche producidos.

6.2.1. Composición química y contenido energético de los suplementos

En el pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinum*) y en los complementos alimenticios ofrecidos a los animales durante el experimento, se cuantificaron las concentraciones de: proteína cruda (PC, método de Kjeldahl, norma Icontec NTC-4657), Fibra en detergente neutro (FDN, norma AOAC 2002.04), Fibra en detergente ácido (FDA, norma AOAC 973.18), cenizas (Cen, norma AOAC 942.05), extracto etéreo (EE, norma Icontec NTC-668), lignina (Lig, Permanganato de potasio), proteína cruda insoluble en detergente neutro (PCIDN,

norma AOAC 2002.04 y Kjeldahl Icontec NTC-4657), proteína cruda insoluble en detergente ácido (PCIDA, norma AOAC 973.18 y Kjeldahl Icontec NTC-4657). Estos resultados se presentan en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Composición química promedio (n=5) del pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinum*) ofrecido a los animales durante el experimento.

	PC	PCIDN	FDN	FDA	EE	Cen	Lig	CNE
% de la materia seca								
Promedio	17.3	5.2	61.6	32	2.1	9.6	4.3	14,6
Maximo	17.6	5.9	64.6	34.4	2.82	10.3	5	18.8
Minimo	17.2	4.2	58.1	30.8	1.56	8.99	3.3	11.2
C.V. %	1.12	13.5	3.84	453	23.6	4.8	17.8	19.6

PC= proteína cruda; **PCIDN**= proteína insoluble en detergente neutro; **EE**= extracto etéreo; **FDN**= fibra en detergente neutro; **FDA**= fibra en detergente ácido; **Cen**= cenizas; **Lig**= lignina; **CNE**= carbohidratos no estructurales ($CNE = 100 - (PC + EE + FDN + Cen) + PCIDN$).

Tabla 2. Composición química promedio (n=7) del suplemento alimenticio base utilizado en los experimentos.

	PC	PCIDN	PCIDA	FDN	FDA	EE	Cen	Lig	CNE
% de la materia seca									
Promedio	15.54	1.43	0.56	25.17	8.19	6.03	10.00	2.43	41.83
Maximo	16.70	1.80	0.70	27.00	9.10	6.65	10.91	2.90	43.92
Minimo	13.40	1.30	0.40	23.90	7.40	5.47	7.96	1.90	40.69
C.V. %	7.53	12.60	17.52	4.29	7.64	9.59	9.79	13.80	2.51

PC= proteína cruda; **PCIDN**= proteína insoluble en detergente neutro; **EE**= extracto etéreo; **FDN**= fibra en detergente neutro; **FDA**= fibra en detergente ácido; **Cen**= cenizas; **Lig**= lignina; **CNE**= carbohidratos no estructurales ($CNE = 100 - (PC + EE + FDN + Cen) + PCIDN$).

El complemento alimenticio fue elaborado en la planta de concentrados del centro San Pablo, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Una fórmula básica fue utilizada para todos los experimentos, la cual se detalla en la tabla 3. Acorde con el experimento la fórmula básica recibía la adición de la respectiva fuente de cada factor

lipotrópico, para metionina Aminoshure-M® (75% L-Metionina, Balchem USA), para colina Reashure-M® (25% de Colina, Balchem USA) y para Carnitina Fumarato de L-Carnitina (58%, de L-Carnitina, Suzhou Vitajoy Biotech, Co China)

Tabla 3. Ingredientes utilizados en la formulación del suplemento alimenticio utilizado en los diferentes experimentos.

Ingrediente (% de la formula)	Preparto	Posparto
Maíz amarillo	35	35
Torta de soya 46.5	5	5
Preparado forrajero feed (Ingredion®)	30	30
Salvado de trigo	13,1	11,67
Aceite de palma	2,5	2,5
Melaza de caña	7,0	7,0
Calcita mineral (caco3)		2,0
Fosfato mono-bicálcico		1,6
Bicarbonato sódico		0,1
Cloruro sódico (sal marina)	1,0	1,0
Sulfato de magnesio	0,1	0,1
Azufre	0,2	0,2
Premezcla vitamínica y mineral	0,1	0,1
Oxido de cromo	1	0,4
Aminoshure-M®	1.0*	0.33*
Reashure-M®	3 o 6**	1 o 2**
Fumarato de L- carnitina	5 o 10***	1.67 o 3,33***
Inhimol p®	0,10	0,10
Mycoad®	0,20	0,20
Adinox p®	0,01	0,01
Total	100	100

*Estas concentraciones de Aminoshure-M® garantizan un consumo de 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 de Reashure-M® garantizan un consumo de 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.

***Estas concentraciones de fumarato de L-carnitina garantizan un consumo de 58 o 116 g/d de L-carnitina 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.

6.2.2. Degradabilidad Ruminal *in situ* del Reashure® y Aminoshure-M®

En una investigación previa Montoya (2015), caracterizó la cinética de la degradación ruminal de los compuestos Reashure® y Aminoshure-M®. A continuación se describe la metodología empleada por este autor. Tres vacas Holstein fistuladas al rumen que se encontraban pastoreando praderas de Kikuyo se les suministro durante cinco días 1 kg de concentrado comercial que contenía 20 y 60 gramos de Aminoshure-M® y Reashure® respectivamente. Luego de este periodo (día 6) se realizó la prueba de degradabilidad. Se tomaron 42 bolsas de Nylon de 12 x 4 cm, se marcaron y se secaron a 60°C durante 24 horas; 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), las bolsas fueron secadas nuevamente por 24 horas a 60°C. Se registró el peso de cada una de las bolsas con el compuesto seco. 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 estas quedaran limpias. Posteriormente fueron secadas a 60°C por 48h y pesadas. Finalmente se tomaron los residuos de las 3 repeticiones de cada uno de los 7 tiempos para determinar la cinética de la degradación.

Montoya (2015) reportó que luego de 24 h de incubación, solo se alcanzó a degradar el 3.2% del Reashure®, indicando que este producto es altamente resistente a la fermentación en el rumen. Respecto al Aminoshure-M®, este mismo autor reporto una degradabilidad en el rumen del 30% de la MS a las 24 horas de incubación.

6.2.3 Degradabilidad del Fumarato de L-Carnitina.

Siguiendo la metodología descrita por Montoya (2015) para la determinación de la cinética de la degradabilidad ruminal del Reashure® y Aminoshure-M®, Madrid (2015) intentó determinar la cinética de degradabilidad ruminal del Fumarato de L-Carnitina, lo que fue imposible de realizar debido a que su tamaño de partícula permitió el escape del material

tan solo a 2 horas de su incubación. Debido a esto Madrid (2015), realizó pruebas de incubación in vitro, las cuales se describen a continuación. La incubación se realizó en tubos de vidrio con capacidad de 10 ml, los cuales se lavaron con abundante agua y fueron secados en estufa a 110 °C por 12 horas. Se estimó que acorde con el volumen (5 ml) de inóculo ruminal en cada tubo, con la adición de 10 o 20 mg de fumarato de L-carnitina a cada tubo se conseguían concentraciones equivalentes (0.20 y 0.40%) a las resultantes en los animales sometidos a suplementación con 100 y 200 g/d de fumarato de L-carnitina. El líquido ruminal fue obtenido de tres vacas Holstein con fístula ruminal permanente, en condiciones de pastoreo consumiendo pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), los animales pertenecen al Centro de producción Paysandú, de la Universidad Nacional de Colombia (Sede Medellín). La recolección de líquido ruminal se realizó a las 06:00 horas y fue extraído manualmente de varias partes del rumen y filtrado en paños de algodón, almacenado en tres contenedores térmicos a 40°C, y transportados al laboratorio de Fisiología Animal de la Universidad Nacional (Sede Medellín). El líquido ruminal de cada animal fue nuevamente filtrado y transferido a tres erlenmeyer, saturados con CO₂ y mantenidos en estufa a 39 °C. Los tubos fueron inoculados con 5 ml de líquido ruminal. Para cada concentración de fumarato de L-carnitina (0.20 o 0.40%) en cada tiempo se prepararon 4 tubos. Para cada tiempo de incubación se utilizó una serie de 4 tubos como blancos que contienen inóculo pero sin fumarato de L-carnitina. Los tubos fueron saturados con CO₂ y sellados con tapón de caucho, dispuestos en cajas de icopor con espesor 1.5 cm e incubados en estufa con ventilación forzada a 39 °C. Para determinar la degradación de la MS del fumarato de L-carnitina los tubos fueron retirados del proceso de incubación a los 15, 30, 60, 120, 240 y 360 minutos. Estos tubos fueron refrigerados a 4 °C, para detener el proceso de degradación. El contenido de cada tubo se filtró a través de papel filtro de peso conocido. La MS degradada fue determinada por el secado del material filtrado a 65 °C por 48 horas hasta obtener peso constante.

El porcentaje de degradación del fumarato de L-Carnitina fue cercano al 90%. Pese a la alta degradabilidad del fumarato de L-carnitina, se decidió continuar la experimentación con este producto, pues al momento de realizar la investigación era la única fuente comercial de L-carnitina disponible para su utilización dietaria. Debido a su alta

degradabilidad, fue necesario incluir dosis de 100 y 200 g/d de fumarato de L-carnitina para suministrar entre 5.8 y 11.6 g/d de L-Carnitina disponible para su absorción intestinal, esto originó una muy baja eficiencia económica en su utilización.

6.3. Experimentos

Los animales fueron asignados al azar a cada experimento y a cada tratamiento. Debido a que los experimentos no se realizaron con el mismo número de tratamientos, el número de animales por tratamiento para cada experimento, fue calculado de tal modo que se obtuviera un mínimo de 18 grados de libertad del error experimental. De este modo se garantiza una potencia mínima en la prueba de hipótesis en los tres experimentos (Correa, G. Comunicación personal, septiembre de 2013).

6.3.1. Efecto del nivel de complementación con Metionina-Colina

- **Grupo control:** conformado por seis vacas que recibieron complemento alimenticio que no contenía factores lipotrópicos.

- **Tratamiento 1:** conformado por seis vacas que recibieron complemento alimenticio conteniendo 20 gramos por día de una fuente comercial de L-Metionina protegida de la degradación ruminal.

-

- **Tratamiento 2:** conformado por seis vacas que recibieron complemento alimenticio conteniendo 20 g por día de una fuente comercial de L- Metionina protegida de la degradación ruminal, este complemento también contenía 60 g por día de una fuente comercial de Colina protegida de la degradación ruminal.

- **Tratamiento 3:** conformado por seis vacas que recibieron complemento alimenticio conteniendo 20 g por día de una fuente comercial de L- Metionina protegida de la degradación ruminal, este complemento también contenía 120 g por día de una fuente comercial de Colina protegida de la degradación ruminal.

6.3.2. Efecto del nivel de complementación con L- Carnitina

- **Grupo control:** conformado por siete vacas que recibieron complemento alimenticio que no contenía fumarato de L-Carnitina.
-
- **Tratamiento 1:** conformado por siete vacas que recibieron complemento alimenticio conteniendo 100g por día de fumarato de L- Carnitina
- **Tratamiento 2:** conformado por siete vacas que recibieron complemento alimenticio conteniendo 200 g por día de fumarato de L- Carnitina.

6.3.3. Efecto del nivel de complementación con diferentes combinaciones de Metionina-Colina y L- Carnitina

- **Grupo control:** conformado por cinco vacas que recibieron complemento alimenticio que no contenía factores lipotrópicos.
-
- **Tratamiento 1:** conformado por cinco vacas que recibieron complemento alimenticio conteniendo: 20g por día de una fuente comercial de L- Metionina protegida de la degradación ruminal, 60g por día de una fuente comercial de Colina protegida de la degradación ruminal, y 100g por día de fumarato de L- Carnitina.
- **Tratamiento 2:** conformado por cinco vacas que recibieron complemento alimenticio conteniendo: 20g por día de una fuente comercial de L- Metionina protegida de la degradación ruminal, 60g por día de una fuente comercial de Colina protegida de la degradación ruminal, y 200g por día de fumarato de L- Carnitina.
- **Tratamiento 3:** conformado por cinco vacas que recibieron complemento alimenticio conteniendo 120g por día de una fuente comercial de Colina protegida de la degradación ruminal y 100g por día de fumarato de L- Carnitina.
- **Tratamiento 4:** conformado por cinco vacas que recibieron complemento alimenticio conteniendo 120g por día de una fuente comercial de Colina protegida de la degradación ruminal y 200g por día de fumarato de L- Carnitina.

Tabla 4. Resumen de los tratamientos en los diferentes experimentos.

Tratamiento	Aminoshure®	Reashure®	Fumarato de L-Carnitina
Control	0	0	0
EXPERIMENTO 1. Efecto del nivel de complementación con Metionina Colina			
Tratamiento 1	20 g diarios	0	0
Tratamiento 2	20 g diarios	60 g diarios	0
Tratamiento 3	20 g diarios	120 g diarios	0
EXPERIMENTO 2. Efecto del nivel de complementación con L-Carnitina			
Tratamiento 1	0	0	100 g diarios
Tratamiento 2	0	0	200 g diarios
EXPERIMENTO 3. Efecto del nivel de complementación con diferentes combinaciones de Metionina-Colina y L- Carnitina			
Tratamiento 1	20 g diarios	60 g diarios	100 g diarios
Tratamiento 2	20 g diarios	60 g diarios	200 g diarios
Tratamiento 3	0	120 g diarios	100 g diarios
Tratamiento 4	0	120 g diarios	200 g diarios

6.4. Toma de muestras.

Los animales experimentales recibieron los tratamientos desde el día 260 de gestación y hasta el día 20 posparto. Todos los animales fueron pesados al inicio del experimento y se les calificó la condición corporal. Luego de 10 días de recibir los tratamientos experimentales (día 270 de gestación), se inició la toma de muestras. El día 270 de gestación, el día del parto y a los días 10 y 20 posparto se les tomó muestras de sangre, se pesaron y se les calificó la condición corporal (Edmonson *et al*, 1989; Hady *et al*, 1994). El día 270 de gestación, y a los días 10 y 20 posparto se tomaron biopsias de hígado.

6.4.1. Sangre periférica

Se tomaron muestras de sangre entre las 10 y 11 a.m. de la vena coccígea en tubos al vacío, secos, con EDTA y heparina. Las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 5 minutos, se les separó el suero o el plasma 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 el laboratorio de Ciencias Básicas Animales de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.

6.4.2. Muestras hepáticas

Para su realización los animales fueron sedados con xilazina (0,15 ml por cada 100 Kg de peso, vía intravenosa). En el sitio de la incisión se inyectó 10 ml de lidocaína® como anestésico local. Se efectuó la biopsia hepática por medio de la utilización de una aguja Tru-cut® a través de una incisión de 1 cm de longitud en el 11avo espacio intercostal siguiendo la metodología descrita por Van den Top *et al* (1995). Se obtuvieron muestras de aproximadamente 50 mg de tejido, las cuales se sumergieron en viales de 2 ml conteniendo solución Hartman, las cuales se conservaron a -10°C para su transporte y a -72°C hasta su análisis.

6.5. Determinaciones de laboratorio.

6.5.1. Determinaciones en sangre.

En las muestras de suero para todos los experimentos se cuantificó las concentraciones de AGNES, β -Hidroxibutirato (BHB) y Triglicéridos. Adicionalmente en el experimento 3, se cuantificaron las concentraciones plasmáticas de Glucosa y Urea, con el objetivo de establecer si el fumarato de L-carnitina podría afectar estas variables. Para estimar la concentración de AGNES se utilizó el kit espectrofotométrico Randox NEFA Fa-115 (Randox, UK). La concentración de β -hidroxibutirato se cuantificó utilizando el kit RANBUT RB 1008 (Randox, Reino Unido). Las concentraciones de Triglicéridos utilizando el kit Triglycerides (Biosystems, España). Las concentraciones de urea y glucosa fueron cuantificadas con los kits UREA/BUN COLOR y GLUCOSA OXIDASA/PEROXIDASA

respectivamente (Biosystems, España). Las determinaciones espectrofotométricas se realizaron utilizando un espectrofotómetro Genesys UV-VIS 10S ThermoScientific.

Es necesario aclarar que no fue posible realizar la cuantificación confiable de la apoproteína B-100. Las determinaciones se realizaron mediante la técnica ELISA utilizando el kit Bovine Apo-B100 ELISA No.E0603b (Usclife, Wuhan, China), y un lector Thermo Scientific Multiskan FC. Los resultados carecieron de reproducibilidad y precisión, se obtuvieron coeficientes de regresión lineal entre 0.78 y 0.85 en las curvas de calibración, la diferencia promedio entre la concentración esperada y la concentración hallada en el control fue de $38.78 \pm 13\%$. No se tuvo posibilidad de determinar la concentración de apoproteína B-100, pues era el único método disponible en el mercado.

6.5.2. Determinaciones en hígado.

En las muestras de hígado provenientes de todos los experimentos se determinaron las concentraciones de triglicéridos, carnitina total, carnitina libre y acil-carnitina. Mientras que la concentración de la colina presente en los fosfolípidos (colina-fosfolípidos) se cuantificó en los experimentos que recibieron complementación con colina (experimentos 1 y 3). La concentración de ácidos grasos libres (AGL) en hígado solo fue determinada en el experimento 3, como un análisis complementario al análisis de triglicéridos, pues en este experimento la concentración de triglicéridos hepáticos tendió a ser más baja en unos tratamientos, y el análisis de AGL complementarían esta observación.

6.5.2.1. Obtención del extracto lipídico.

Para determinar las concentraciones hepáticas de: triglicéridos, de colina presente en los fosfolípidos (colina-fosfolípidos) y de ácidos grasos libres (AGL), se procedió a preparar un homogenado de hígado. Los viales de solución Hartmann conteniendo las muestras de hígado se descongelaron a temperatura ambiente, con una pinza se extrajo el tejido hepático y se colocó sobre papel absorbente por 10 segundos para retirar el exceso de humedad y los restos de fibrina. Posteriormente la muestra se colocó en un tubo de tubo fondo redondo, tapa rosca 13 x 100 mm, vidrio (7.5ml) previamente rotulado y pesado (los tubos fueron secados a 60 °C por 3 horas, rotulados y pesados en una balanza analítica, sensibilidad = 0.1 mg). Seguidamente se procedió a homogenizar manualmente la

muestra utilizando un embolo de acero inoxidable. Una vez obtenido el homogenado se pesó nuevamente el tubo. Se sustrajo el peso del tubo vacío y se obtuvo el peso del homogenado fresco de hígado. El peso promedio obtenido fue de 49.6 ± 18.45 gramos por homogenado. La extracción de los lípidos totales se basó en la técnica descrita por Starke et al (2010), pero con modificaciones introducidas en la presente investigación respecto al método de evaporación de los solventes, las cuales se describen más adelante.

Al tubo conteniendo el homogenado de hígado se le adicionaron 2 ml de una mezcla 3:2 de hexano al 95% e isopropanol. Se verificó el cierre hermético de los tubos y se colocaron en un rotador vertical Bio RS-24 (Boeco, Germany) a 30 rpm y a temperatura ambiente por 24 Horas. Seguidamente a cada tubo se le adicionó 1 ml de una solución (0.455 mmol/l) de sulfato de sodio (Na_2SO_4). Los tubos fueron llevados al vortex y se centrifugaron a 2000g por 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante constituye los solventes con los lípidos disueltos. El sobrenadante fue traspasado a un tubo similar previamente rotulado y pesado. Para garantizar el enjuague completo del residuo de la muestra 1 ml de hexano fue adicionado de nuevo al precipitado, se llevó al vortex y se centrifugó a 2000g por 10 minutos a temperatura ambiente, el sobrenadante fue removido y adicionado al sobrenadante previamente traspasado. Para la eliminación total de los solventes cada tubo fue llevado a rota evaporación en un equipo marca IKA modelo MVP 015-2 con sistema de calentamiento por inmersión en baño de agua y control de temperatura a una presión de vacío de 745 mbar, temperatura de calentamiento de 60 °C y velocidad de rotación de 80 rpm.

Con el objeto de eliminar la humedad residual los tubos fueron colocados a 35 °C y 230 mbar por 10 minutos en una estufa de vacío VD 53-UL (Binder, Germany), una vez estabilizada la temperatura de los tubos con la temperatura ambiente, cada tubo fue pesado. El peso de los lípidos totales extraídos se calculó por sustracción del peso del tubo vacío. El contenido total de lípidos se calculó gravimétricamente en mg de lípidos totales por gramo de tejido hepático, considerando la cantidad inicial de homogenado hepático utilizado.

6.5.2.2. Determinación de las fracciones lipídicas: triglicéridos, colina-fosfolípidos y ácidos grasos libres.

Los tubos conteniendo el extracto lipídico fueron tapados y refrigerados hasta su análisis. A los tubos conteniendo el extracto lipídico que en promedio fue de 3.4 ± 1.12 mg, se les adicionó 500 μ l de hexano (95%), esto con el fin de conseguir suficiente volumen para la determinación de las fracciones: triglicéridos, colina-fosfolípidos y ácidos grasos libres, y para conseguir diluir los lípidos totales en el intervalo de concentración compatible con estas mismas determinaciones. Se realizó suficiente vortex en el extracto lipídico diluido y en viales de reacción de 2 ml se colocaron diferentes cantidades de extracto lipídico según la fracción a cuantificar (40 μ l para triglicéridos, 10 μ l para fosfolípidos, 16 μ l para ácidos grasos libres). Los tubos de reacción fueron llevados a 35 °C y 230 mbar por 10 minutos en una estufa de vacío VD 53-UL (Binder, Germany), de este modo el hexano fue removido por evaporación y en el tubo de reacción quedaron adheridas las fracciones lipídicas. A cada tubo de reacción se le adicionó una cantidad de solución buffer equivalente al extracto lipídico recibido. La solución buffer contenía 48.1 mmol/l de Difosfato de sodio (Na_2HPO_4), a pH 7 (ajustada con 5 M de HCl) y 1 μ mol/l de Polietilen glicol hexadecil eter, Polioxietilen (20) cetil-eter (Brij58®, Sigma) como detergente no iónico. Posteriormente se aplicó la metodología de cuantificación respectiva para cada fracción. Para triacilglicéridos se utilizó el kit TRO 100 (Sigma Chemical Co, St Louis, MO), para colina-fosfolípidos el kit phospholipids B kit number 990-54009; (WAKO, Richmond, VA) y para ácidos grasos libres (AGL) se utilizó el kit Randox NEFA Fa-115 (Randox, UK).

6.5.2.3. Cuantificación de las diferentes formas de Carnitina.

Para la cuantificación de las diferentes formas de carnitina, una muestra de hígado de 52.17 ± 23.26 mg se depositó en viales cónicos de 2 ml, se le adicionó un 1 ml de una solución buffer que contenía 48.1 mmol/l de Difosfato de sodio (Na_2HPO_4), a pH 7 (ajustada con 5 M de HCl) y 1 μ mol/l de Polietilen glicol hexadecil eter, Polioxietilen (20) cetil-eter (Brij58®, Sigma) como detergente no iónico. Se utilizó un homogenizador eléctrico a 2000 RPM hasta la homogenización completa del tejido. Seguidamente los viales fueron centrifugados a 2000g x 5 minutos. Se descartó el precipitado y 1 ml de

sobrenadante fue utilizado para la determinación de Carnitina total, Carnitina libre y Acil Carnitina utilizando el método descrito por Prieto *et al* (2006).

6.6. Estimación del Balance Nutricional

El día 270 de gestación y el día 10 y 20 postparto se estimó el balance de energía neta de lactancia (ENI), el cambio de peso y los balances de proteína metabolizable (PM) y de proteína degradable en rumen (PDR). Las variables peso, producción de leche y composición de la leche de cada individuo según corresponda se utilizaron para la estimación de los requerimientos según el NRC (2001). El día 10 y 20 posparto a cada vaca durante el ordeño de la mañana y de la tarde se le tomaron muestras de leche, las cuales fueron inmediatamente refrigeradas y conducidas al Laboratorio de Leches de la Universidad Nacional, sede Medellín, donde se les determinó la concentración de grasa por el método Babcock, mientras que para la concentración de proteína se utilizó un Milkoscan®.

El consumo total de las fracciones ENI, PM y PDR se estimó por la sumatoria entre el consumo de la fracción del forraje más el consumo de la fracción en el complemento alimenticio. Para tal efecto la valoración de ENI, PM y PDR del forraje y del complemento alimenticio se realizó utilizando las ecuaciones propuestas por el NRC (2001) para cada caso. El consumo de materia seca del forraje fue estimado por Montoya (2015), y por Madrid (2015), utilizando la técnica del doble marcador, la cual se describe a continuación. El óxido de cromo (Cr_2O_5) fue utilizado como marcador externo para estimar la producción de heces (Lippke, 2002), mientras que la digestibilidad de la materia seca se cuantificó según la propuesta de Sunvold y Cochran (1991), en este caso se utilizó la fibra en detergente ácido indigerible como marcador interno. La tasa de recuperación del cromo en las heces fue estimada según los reportes de Correa *et al* (2009). La estimación del consumo de materia seca del forraje se realizó reemplazando los parámetros anteriores en la ecuación propuesta por Correa *et al* (2009). El consumo de suplemento alimenticio fue calculado como la diferencia entre la cantidad (kg) de suplemento ofrecido y la cantidad rechazada.

6.7. Análisis estadístico.

Se realizaron análisis de medidas repetidas en el tiempo utilizando el PROC MIXED del paquete estadístico SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, 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 covariable1, β_2 = Efecto de la covariable 2, β_3 = Efecto de la covariable3, 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

7. Resultados

7.1. Experimento 1. Efecto del nivel de complementación con Metionina-Colina

No se presentaron interacciones entre los tratamientos y los periodos de muestreo para ninguna de las variables analizadas, por tal razón se presentaron solo los efectos simples de tratamiento y de periodo de medición.

7.1.1. Efecto del suministro de colina y metionina sobre las variables determinantes del balance nutricional

En la Tabla 5 se presentan las variables determinantes del balance nutricional para cada uno de los tratamientos. Como se observa no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos respecto a estas variables.

Tabla 5. Medias por tratamiento para las variables determinantes del balance nutricional en vacas Holstein sometidas a diferentes niveles de inclusión de Colina y Metionina.

Variable	T0	T1	T2	T3	E.E	<i>p</i>
CMSf (Kg/d)	10.5	8.37	10.2	9.74	0.8344	0.31
CMSst (Kg/d)	14.9	12.7	14.7	14.2	0.8273	0.28
Prod L (Kg/d)	24.2	23.8	22.4	26.5	1.1912	0.14
Prot L (%)	2.95	3.08	2.89	2.87	0.0792	0.26
Grasa L (%)	3.40	3.47	3.73	3.25	0.2399	0.60
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
Cond Corporal Inicial	3.25	3.42	3.44	3.45		
	(± 0.25)	(± 0.38)	(± 0.38)	(±0.31)		

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. La inclusión de las covariables condición corporal al inicio del experimento, número de partos y la producción de leche corregida en la lactancia anterior no tuvo efecto significativo ($p > 0.05$).

CMSf: Consumo de materia seca del forraje. CMSst: Consumo de materia seca total. Prod L: Producción de leche. Prot L: % de Proteína en la leche. Grasa L: % de grasa en la leche. 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. Condición Corporal Inicial: Condición corporal al inicio del experimento (día 260 de gestación).

No se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos para el consumo de materia seca, la producción de leche y sus contenidos de grasa y proteína.

La tabla 6 presenta las variables condicionantes del balance nutricional por periodos de muestreo. Como se observa se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre la mayoría de estas variables

Tabla 6. Medias por periodos de muestreo para las variables determinantes del balance nutricional en vacas Holstein sometidas a diferentes niveles de inclusión de Colina y Metionina.

Variable	10 Preparto	10 Posparto	20 Posparto	E.E	<i>p</i>
CMSf (Kg/d)	9.64ab	8.64a	10.8b	0.5858	0.023
CMSt (Kg/d)	11.4a	14.2b	16.7c	0.5934	<0.0001
Prod L (Kg/d)	-	25.0a	26.4a	0.7374	0.55
Grasa L (%)	-	3.50a	3.53a	0.1764	0.5882
Prot L (%)	-	2.94b	2.76a	0.0711	<0.0001
BaENL (Mcal/d)	2.83b	-5.99a	-4.19a	1.3125	<.0001
BaPM (g/d)	251.39c	-132.24a	-81.70b	51.542	<.0001
BaPDR (g/d)	86.05b	0.03a	-6.02a	4.300	<.0001
C peso (Kg/d)	0.47b	-1.20a	-0.84a	0.2476	<.0001

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. La inclusión de las covariables condición corporal al inicio del experimento, número de partos y la producción de leche corregida en la lactancia anterior no tuvo efecto significativo ($p > 0.05$).

CMSf: Consumo de materia seca del forraje. CMSt: Consumo de materia seca total. Prod L: Producción de leche. Prot L: % de Proteína en la leche. Grasa L: % de grasa en la leche. 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.

Se puede observar que en los periodos de muestreo se presentaron diferencias en cuanto a las variables condicionantes del balance nutricional, excepto la producción de leche y su contenido de grasa.

7.1.2. Efecto del suministro de colina y metionina sobre los indicadores plasmáticos de movilización, oxidación y exportación de lípidos.

En la Tabla 7 se presentan las concentraciones de triglicéridos (TG), ácidos grasos no esterificados (AGNES), β -hidroxibutirato (BHB) en los diferentes tratamientos, como se puede observar se encontraron diferencias significativas respecto a las concentraciones plasmáticas β -hidroxibutirato.

Tabla 7. Medias por tratamiento de las concentraciones plasmáticas de triglicéridos (TG), ácidos grasos no esterificados (AGNES), β -hidroxibutirato (BHB) en vacas Holstein sometidas a diferentes niveles de inclusión de Colina y Metionina.

Variable	T0	T1	T2	T3	E.E	<i>p</i>
TG (mg/dL)	33.4a	33.0a	31.4a	34.2a	2.1939a	0.5952
AGNES (mmol/L)	0.16a	0.13a	0.18a	0.18a	0.0247	0.4419
BHB (mmol/L)	0.68a	0.88a	1.16b	0.91ab	0.0942	0.0157

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®.

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. La inclusión de las covariables condición corporal al inicio del experimento, número de partos y la producción de leche corregida en la lactancia anterior no tuvo efecto significativo. ($p > 0.05$).

Los tratamientos no afectaron las concentraciones plasmáticas de AGNES, lo que estaría indicando que ni la metionina ni su combinación con colina, estarían asociados con el grado de movilización de AGNES. Sin embargo, las concentraciones plasmáticas de β -hidroxibutirato fueron significativamente más bajas en el tratamiento control y en el tratamiento que solo recibió metionina, indicando una mayor formación de cuerpos cetónicos en los tratamientos complementados con combinaciones de colina y metionina

En la tabla 8 se presentan las concentraciones de los indicadores plasmáticos de movilización, oxidación y exportación de lípidos por periodos de muestreo. Como se puede observar se encontraron diferencias significativas para las variables triglicéridos (TG), AGNES y β -hidroxibutirato (BHB).

Tabla 8. Medias por periodos de muestreo de las concentraciones plasmáticas de TG, AGNES y BHB de vacas Holstein sometidas a diferentes niveles de inclusión de Colina y Metionina.

Variable	10 Preparto	Parto	10 Posparto	20 Posparto	E.E	<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 ($p < 0.05$).

EE: máximo valor del error estándar de la media. *p*: probabilidad de cometer el error Tipo I. La inclusión de las covariables condición corporal al inicio del experimento, número de partos y la producción de leche corregida en la lactancia anterior no tuvo efecto significativo ($p > 0.05$).

Durante el preparto se presentaron los valores más altos de triglicéridos plasmáticos y los valores más bajos de AGNES y BHB, la causa más probable pudo ser un balance nutricional más favorable, pues durante este periodo no hubo pérdida de peso y los balances de energía neta de lactancia (ENL) y de proteína metabolizable (PM) fueron superiores respecto a los demás (véase tabla 6).

7.1.3. Efecto del suministro de colina y metionina sobre las concentraciones hepáticas de triglicéridos, colina y carnitina.

Para los triglicéridos hepáticos no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, indicando que ni la suplementación con metionina (T1), ni la suplementación con metionina más una dosis baja de colina (T2), ni la suplementación con metionina más una dosis alta de colina (T3) fueron efectivas en la generación de moléculas transportadoras de triglicéridos hepáticos que condujeran a la disminución de su concentración en hígado. Estos resultados están acorde con lo encontrado para la variable triglicéridos plasmáticos. Se observó una leve tendencia ($p = 0.118$) a la disminución en los triglicéridos hepáticos en los tratamientos T2 y T3. Sin embargo el valor de triglicéridos hepáticos en el tratamiento control fue relativamente bajo. Las concentraciones hepáticas de colina no difirieron entre periodos de muestreo. Se pudo observar que el tratamiento que solo recibió suplementación con metionina (T1) presento concentraciones significativamente bajas de colina en hígado, sin embargo las concentraciones de colina en el tratamiento control (T0) y en los que recibieron colina (T2

y T3) no fueron significativamente diferentes. No se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos respecto a las concentraciones hepáticas de carnitina. Los resultados se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. 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)	39.13a	47.30a	37.80a	35.25a	3.55	0.11
Colina (mg/g hígado fresco)	1.52b	1.30a	1.66b	1.48ab	0.067	0.022
Carnitina Total (nmol/g hígado fresco)	114.70a	115.25a	110.94a	117.62a	15.29	0.88
Carnitina Libre (nmol/g hígado fresco)	70.32a	81.54a	75.69a	69.46a	13.55	0.88
Acil-Carnitina (nmol/g hígado fresco)	43.64a	44.05a	40.26a	48.17a	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®.

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. La inclusión de las covariables condición corporal al inicio del experimento, número de partos y la producción de leche corregida en la lactancia anterior no tuvo efecto significativo ($p > 0.05$).

No se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre periodos de muestreo para las concentraciones hepáticas de triglicéridos, colina y las diferentes formas de carnitina. Estos resultados se presentan en la tabla 10.

Tabla 10. Medias por periodo de muestreo de las concentraciones hepáticas de triglicéridos, colina y carnitina de vacas Holstein sometidas a diferentes niveles de inclusión Metionina-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

EE: máximo valor del error estándar de la medía. p : probabilidad de cometer el error Tipo I. La inclusión de las covariables condición corporal al inicio del experimento, número de partos y la producción de leche corregida en la lactancia anterior no tuvo efecto significativo ($p>0.05$).

7.2. Experimento 2. Efecto del nivel de complementación con Fumarato de L-Carnitina.

No se presentaron interacciones entre los tratamientos y los periodos de muestreo para ninguna de las variables analizadas, por tal razón se presentaron solo los efectos simples de tratamiento y de periodo de medición.

7.2.1. Efecto del suministro de Fumarato de L-Carnitina sobre las variables determinantes del balance nutricional

En la Tabla 11 se presentan las variables determinantes del balance nutricional para cada uno de los tratamientos. Como se observa no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos respecto a estas variables.

Tabla 11. Medias por tratamiento para las variables determinantes del balance nutricional en vacas Holstein sometidas a diferentes niveles de inclusión de Fumarato de L-Carnitina.

Variable	T0	T1	T2	E.E	p
CMSf (Kg/d)	10.4	9.7	9.9	0.72	0.78
CMSt (Kg/d)	14.8	14.3	13.7	0.58	0.38
Prod L (Kg/d)	24.17	24.41	22.85	1.52	0.61
Prot L (%)	2.85	3.01	3.44	1.15	0.51
Grasa L (%)	3.31	3.47	3.50	0.24	0.83
BaENL (Mcal/d)	-1.33	-0.65	-1.39	1.87	0.95
BaPM (g/d)	58.75	38.30	-58.66	76.54	0.52
BaPDR (g/d)	34.28	18.54	28.39	6.06	0.19
C peso (Kg/d)	-0.357	-0.180	-0.382	0.339	0.90
Cond Corporal Inicial	3.25 (±0.25)	3.38 (±0.32)	3.25 (±0.18)		

T0: Control. T1: 100 g/d Fumarato de L-Carnitina. T2: 200 g/d Fumarato de L-Carnitina.

EE: máximo valor del error estándar de la media. *p*: probabilidad de cometer el error Tipo I. La inclusión de las covariables condición corporal al inicio del experimento, número de partos y la producción de leche corregida en la lactancia anterior no tuvo efecto significativo ($p > 0.05$).

CMSf: Consumo de materia seca del forraje. CMSt: Consumo de materia seca total. Prod L: Producción de leche. Prot L: % de Proteína en la leche. Grasa L: % de grasa en la leche. 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. Condición Corporal Inicial: Condición corporal al inicio del experimento (día 260 de gestación).

La tabla 12 muestra los resultados para las variables determinantes del balance nutricional por periodos de muestreo, como se observa se presentaron diferencias estadísticamente significativas en las variables consumo de materia seca, producción de leche y su contenido de proteína y en el cambio de peso y los balances de ENL, PDR y PM.

Tabla 12. Medias por periodos de muestreo para las variables determinantes del balance nutricional en vacas Holstein sometidas a diferentes niveles de suplementación con Fumarato de L-Carnitina

Variable	10 Preparto	10 Posparto	20 Posparto	E.E	<i>p</i>
CMSf (Kg/d)	10.8b	8.2a	10.9b	0.73	0.060
CMSt (Kg/d)	12.6a	13.9ab	16.8b	0.76	0.050
Prod L (Kg/d)	-	23.42a	26.35b	1.1010	0.035
Grasa L (%)	-	3.35a	3.26a	0.2034	0.207
Prot L (%)	-	3.31b	2.77a	0.9112	0.0005
BaENL (Mcal/d)	4.64b	-4.17a	-3.84a	1.9402	0.0005
BaPM (g/d)	334.94b	-191.51a	-105.04a	76.9784	<.0001
BaPDR (g/d)	93.50b	-2.32a	-9.97a	4.4685	<0.0001
Cpeso (Kg/d)	0.715b	-0.851a	-0.783a	0.3615	0.0011

Medias con letra distinta dentro de la misma fila son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$). La inclusión de las covariables condición corporal al inicio del experimento, número de partos y la producción de leche corregida en la lactancia anterior no tuvo efecto significativo ($p > 0.05$).

EE: máximo valor del error estándar de la media. *p*: probabilidad de cometer el error Tipo I
 CMSf: Consumo de materia seca del forraje. CMSt: Consumo de materia seca total. Prod L: Producción de leche. Prot L: % de Proteína en la leche. Grasa L: % de grasa en la leche. 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.

7.2.2. Efecto del suministro de Fumarato de L-Carnitina sobre los indicadores plasmáticos de movilización y oxidación lipídica.

Con la intención de corroborar si la alta tasa de degradación ruminal esperada en el fumarato de L-carnitina podría tener efectos sobre la generación de amonio ruminal y su consecuente aumento de la síntesis de urea, se determinaron las concentraciones de urea plasmática, encontrando que los tratamientos suplementados presentaron valores significativamente más altos, como se puede observar en la tabla 13.

No se presentaron diferencias significativas entre tratamientos para las variables AGNES y β -hidroxibutirato, sin embargo se observó una leve tendencia ($P=0.16$) al aumento en los valores de β -hidroxibutirato en los tratamientos suplementados con fumarato de L-carnitina.

Como se observa en la tabla 14 se presentaron diferencias significativas para las concentraciones plasmáticas de AGNES, β -hidroxibutirato, urea y glucosa entre los periodos de muestreo.

Tabla 13. Medias por tratamiento para las concentraciones plasmáticas de AGNES, β -hidroxibutirato y Urea en vacas Holstein sometidas a diferentes niveles de complementación con Fumarato de L-Carnitina.

Variable	T0	T1	T2	EE	<i>p</i>
AGNES (mm/l)	0.152a	0.156a	0.115a	0.2374	0.3864
β-hidroxibutirato (mm/l)	0.680a	0.904a	0.830a	0.0819	0.16
Urea (mg/100ml)	29.95a	40.58b	37.28b	2.18	0.0088

T0: Control. T1: 100 g/d Fumarato de L-Carnitina. T2: 200 g/d Fumarato de L-Carnitina.

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 ($p < 0.05$). La inclusión de las covariables condición corporal al inicio del experimento, número de partos y la producción de leche corregida en la lactancia anterior no tuvo efecto significativo ($p > 0.05$).

Tabla 14. Medias por periodo de muestreo de las concentraciones plasmáticas de AGNES, β -hidroxibutirato, (BHB) glucosa y urea en vacas Holstein suplementadas con Fumarato de L-Carnitina.

Variable	10 Preparto	Parto	10 Posparto	20 Posparto	E.E	<i>p</i>
AGNES (mm/l)	0.1092a	0.2455b	0.1183a	0.09108a	0.01886	<.0001
BHB (mm/l)	0.6922a	0.7027a	0.8903b	0.9339b	0.07412	0.056
Urea (mg/100ml)	37.37b	39.56b	31.29a	35.54ab	1.9609	0.0088
Glucosa (mg/100ml)	60.23a	72.9056b	47.0483a	46.5689a	5.9568	0.0039

Medias con letra distinta dentro de la misma fila son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$). La inclusión de las covariables condición corporal al inicio del experimento, número de partos y la producción de leche corregida en la lactancia anterior no tuvo efecto significativo ($p > 0.05$).

EE: máximo valor del error estándar de la media. *p*: probabilidad de cometer el error Tipo I

Se presentaron diferencias estadísticamente significativas para todos los metabolitos evaluados. Se observa como alrededor del parto las concentraciones de AGNES y glucosa fueron significativamente más altas. Las concentraciones de BHB se incrementaron durante el periodo posparto, por el contrario las concentraciones de urea disminuyeron durante este periodo.

7.2.3. Efecto del suministro de Fumarato de L-Carnitina sobre las concentraciones hepáticas de triglicéridos, Acil-Carnitina, Carnitina libre y Carnitina total.

No se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos respecto a las variables Acil-Carnitina, Carnitina libre y Carnitina total, por el contrario la concentración de triglicéridos hepáticos fue significativamente más baja en el tratamiento 2 (T2), como se observa en la tabla 15.

Tabla 15. Medias por tratamiento para las concentraciones hepáticas de triglicéridos, acil-carnitina y carnitina total en vacas Holstein sometidas a diferentes niveles de inclusión de Fumarato de L- Carnitina.

Variable	T0	T1	T2	EE	<i>p</i>
Triglicéridos (mg/g hígado fresco)	37.60b	41.49b	27.62a	3.57	0.0338
Carnitina Total (nmol/g hígado fresco)	114.70a	117.94a	125.49a	32.28	0.92
Carnitina Libre (nmol/g hígado fresco)	70.32a	90.79a	92.58a	22.54	0.87
Acil-Carnitina (nmol/g hígado fresco)	43.64a	34.95a	39.897a	14.18	0.50

T0: Control. T1: 100 g/d Fumarato de L-Carnitina. T2: 200 g/d Fumarato de L-Carnitina.

Medias con letra distinta dentro de la misma fila son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$). La inclusión de las covariables condición corporal al inicio del experimento, número de partos y la producción de leche corregida en la lactancia anterior no tuvo efecto significativo ($p > 0.05$).

EE: máximo valor del error estándar de la media. *p*: probabilidad de cometer el error Tipo I

No se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre periodos de muestreo para las concentraciones hepáticas de triglicéridos, Acil-Carnitina, Carnitina libre y Carnitina total. Los resultados se presentan en la tabla 16.

Tabla 16. Medias por periodo de muestreo de las concentraciones hepáticas de triglicéridos, y carnitina de vacas Holstein sometidas a diferentes niveles de inclusión Fumarato de L-Carnitina.

Variable	10	10	20	E.E	p
	Preparto	Posparto	Posparto		
Triglicéridos (mg/g hígado fresco)	37.59	33.13	35.98	2.84	0.48
Carnitina Total (nmol/g hígado fresco)	128.39	114.92	101.37	25.86	0.64
Carnitina Libre (nmol/g hígado fresco)	102.87	72.53	80.90	21.46	0.61
Acil-Carnitina (nmol/g hígado fresco)	31.14	36.07	34.67	9.22	0.84

EE: máximo valor del error estándar de la media. *p*: probabilidad de cometer el error Tipo I. La inclusión de las covariables condición corporal al inicio del experimento, número de partos y la producción de leche corregida en la lactancia anterior no tuvo efecto significativo ($p > 0.05$).

7.3. Experimento 3. Efecto del nivel de complementación con diferentes combinaciones de Metionina-Colina y L-Carnitina

No se presentaron interacciones entre los tratamientos y los periodos de muestreo para ninguna de las variables analizadas, por tal razón se presentaron solo los efectos simples de tratamiento y de periodo de medición.

7.3.1. Efecto del suministro de diferentes combinaciones de Metionina, Colina y Fumarato de L-Carnitina sobre las variables determinantes del balance nutricional

Para las variables consumo de materia seca del forraje y total, la producción de leche y su composición, el cambio de peso y los balances nutricionales no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, como se observa en la tabla 17.

Tabla 17. Medias por tratamiento para las variables determinantes del balance nutricional en vacas Holstein sometidas a diferentes combinaciones de Metionina, Colina y Fumarato de L-Carnitina

Variable	T0	T1	T2	T3	T4	E.E	p
CMSf (Kg/d)	10.22a	9.98a	9.91a	7.94a	10.77a	0.86	0.16
CMSst (Kg/d)	14.53a	15.18a	14.49a	12.39a	15.50a	0.91	0.13
Prod L (Kg/d)	24.95a	23.96a	26.06a	24.66a	24.75a	1,22	0.93
Prot L (%)	2,85a	2,95a	3,07a	3,08a	3,08a	0.20	0.50
Grasa L (%)	3.09a	3.59a	3.69a	3.87a	3.43a	0,34	0.47
BaENL (Mcal/d)	-0.55	-0.84	-1.30	-2.93	-0.84	2.22	0.87
BaPM (g/d)	101.91	-2.24	19.31	-50.64	44.20	91.83	0.79
BaPDR (g/d)	36.46	20.40	23.07	15.15	28.31	8.20	0.27
C peso (Kg/d)	-0.206	-0.314	-0.361	-0.694	-0.29	0.40	0.82
Cond Corporal Inicial	3.25 (+/-0.25)	3.42 (+/-0.14)	3.38 (+/-0.14)	3.20 (+/-0.20)	3.30 (+/-0.27)		

T0: Control. T1: 20 g/d Aminoshure® + 60 g/d Reashure® + 100g/d Fumarato de L-Carnitina.

T2: 20 g/d de Aminoshure® + 60 g/d Reashure® + 200 g/d Fumarato de L-Carnitina.

T3: 120 g/d Reashure® + 100 g/d Fumarato de L-Carnitina.

T4: 120 g/d Reashure® + 200 g/d Fumarato de L-Carnitina.

Medias con letra distinta dentro de la misma fila son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$). La inclusión de las covariables condición corporal al inicio del experimento, número de partos y la producción de leche corregida en la lactancia anterior no tuvo efecto significativo ($p > 0.05$).

EE: máximo valor del error estándar de la media. p : probabilidad de cometer el error Tipo I

CMSf: Consumo de materia seca del forraje. CMSt: Consumo de materia seca total. Prod L: Producción de leche. Prot L: % de Proteína en la leche. Grasa L: % de grasa en la leche. 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. Condición Corporal Inicial: Condición corporal al inicio del experimento (día 260 de gestación).

La tabla 18 muestra las medias para las variables determinantes del balance nutricional entre periodos de muestreo, como se observa se presentaron diferencias estadísticamente significativas en las variables consumo de materia seca, cambio de peso y los balances de ENL, PDR y PM.

Tabla 18. Medias por periodos de muestreo para las variables determinantes del balance nutricional en vacas Holstein sometidas a diferentes combinaciones de Metionina, Colina y Fumarato de L-Carnitina.

Variable	10 Preparto	10 Posparto	20 Posparto	E.E	p
CMSf (Kg/d)	12.2298c	6.7979a	10.2652b	0.8918	0.0014
CMSt (Kg/d)	14.0098a	12.443a	16.4979b	0.9301	0.0073
Prod L (Kg/d)	-	25.37a	26.68a	0.9176	0.93
Grasa L (%)	-	3.46a	3.48a	0.2580	0.59
Prot L (%)	-	2.97b	2.89a	0.0711	0.04
BaENL (Mcal/d)	6.61b	-5.91a	-4.58a	1.7026	<.0001
BaPM (g/d)	425.83b	-220.42a	-137.89a	85.8434	<.0001
BaPDR (g/d)	92.19b	-5.44a	-12.73a	4.9877	<.0001
Cpeso (Kg/d)	1.026b	-1.201a	-0.938a	0.3029	<.0001

Medias con letra distinta dentro de la misma fila son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$). La inclusión de las covariables condición corporal al inicio del experimento, número de partos y la producción de leche corregida en la lactancia anterior no tuvo efecto significativo ($p > 0.05$).

EE: máximo valor del error estándar de la media. p : probabilidad de cometer el error Tipo I

CMSf: Consumo de materia seca del forraje. CMSt: Consumo de materia seca total. Prod L: Producción de leche. Prot L: % de Proteína en la leche. Grasa L: % de grasa en la leche. 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.

7.3.2. Efecto del suministro de diferentes combinaciones de Colina, Metionina y Fumarato de L-Carnitina sobre los indicadores plasmáticos de movilización, oxidación y exportación de lípidos.

Los valores de triglicéridos plasmáticos, AGNES y de β -Hidroxibutirato (BHB) presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.056$) entre tratamientos, como se observa en la tabla 19. Los valores de AGNES fueron más bajos en los tratamientos T2 y T4. Respecto a β -hidroxibutirato, las concentraciones fueron significativamente más bajas en T0 y T1, indicando una menor oxidación lipídica en estos tratamientos, y coincide con los valores significativamente más altos de triglicéridos plasmáticos encontrados en estos tratamientos.

Tabla 19. Medias por tratamiento de las concentraciones plasmáticas de AGNES, β -Hidroxibutirato y triglicéridos, en vacas Holstein sometidas a complementación con diferentes combinaciones de Metionina, Colina y Fumarato de L- Carnitina.

Variable	T0	T1	T2	T3	T4	EE	<i>p</i>
AGNES (mm/l)	0.149ab	0.184b	0.125a	0.174b	0.139a	0.0148	0.056
β-Hidroxibutirato (mm/l)	0.680a	0.963ab	0.9901b	1.0567b	1.0514b	0.09483	0.055
Triglicéridos (mg/100ml)	32.50b	30.84b	22.63a	23.82a	23.44a	1.98	0.0039

T0: Control. T1: 20 g/d Aminoshure® + 60 g/d Reashure® + 100g/d Fumarato de L-Carnitina.

T2: 20 g/d de Aminoshure® + 60 g/d Reashure® + 200 g/d Fumarato de L-Carnitina.

T3: 120 g/d Reashure® + 100 g/d Fumarato de L-Carnitina.

T4: 120 g/d Reashure® + 200 g/d Fumarato de L-Carnitina.

Medias con letra distinta dentro de la misma fila son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$). La inclusión de las covariables condición corporal al inicio del experimento, número de partos y la producción de leche corregida en la lactancia anterior no tuvo efecto significativo ($p > 0.05$).

EE: máximo valor del error estándar de la media. *p*: probabilidad de cometer el error Tipo I

La tabla 20 presenta la variación en las concentraciones plasmáticas de AGNES, β -hidroxibutirato y triglicéridos por periodos de muestreo

Tabla 20. Medias por periodo de muestreo de las concentraciones plasmáticas de AGNES, β -Hidroxiacetato (BHB) y triglicéridos en vacas Holstein complementadas con diferentes combinaciones de Metionina, Colina y Fumarato de L- Carnitina.

Variable	10		20		EE	p
	Preparto	Parto	Posparto	Posparto		
AGNES (mm/l)	0.105a	0.229c	0.163b	0.121a	0.01122	<.0001
BHB (mm/l)	0.753a	0.816a	1.054b	1.171b	0.06523	<.0001
Triglicéridos (mg/100ml)	42.11b	21.86a	19.99a	22.64a	1.3974	<.0001

Medias con letra distinta dentro de la misma fila son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$). La inclusión de las covariables condición corporal al inicio del experimento, número de partos y la producción de leche corregida en la lactancia anterior no tuvo efecto significativo ($p > 0.05$). EE: máximo valor del error estándar de la media. p: probabilidad de cometer el error Tipo I

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de AGNES, BHB y triglicéridos en los diferentes tiempos de medición. Se observa como alrededor del parto los valores de AGNES fueron significativamente más altos. Las concentraciones plasmáticas de BHB el día 10 preparto y el día del parto fueron inferiores a los valores encontrados a los días 10 y 20 posparto. Los valores de triglicéridos fueron más altos en el periodo preparto.

7.3.3. Efecto de la complementación dietaria con diferentes combinaciones de Metionina, Colina y Fumarato de L Carnitina sobre las concentraciones hepáticas de Triglicéridos, Colina, Acil-Carnitina, Carnitina libre, Carnitina total y Ácidos Grasos Libres (AGL).

No se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos respecto a las variables acil-carnitina, carnitina libre y total. Por el contrario la concentración de colina fue significativamente más alta en los tratamientos T1, T3 y T4. Respecto a la concentración de triglicéridos y AGL se pudo observar una tendencia ($0.05 < p < 0.1$) en la disminución de estas variables en T3 y T4, sugiriendo efectos de la suplementación con colina y carnitina a estos niveles, sin embargo la concentración de triglicéridos fue relativamente baja en T0. Ninguno de los tratamientos consiguió elevar significativamente las concentraciones de carnitina en hígado. Estos resultados se presentan en la tabla 21.

Tabla 21. Medias por tratamiento de las concentraciones hepáticas de triglicéridos, colina, carnitina total, carnitina libre, acil-carnitina, carnitina total y ácidos grasos libres (AGL) en vacas Holstein sometidas a diferentes combinaciones de Metionina, Colina y Fumarato de L-Carnitina.

Variable	T0	T1	T2	T3	T4	EE	<i>p</i>
Triglicéridos (mg/g hígado fresco)	38.66a	43.62a	48.97a	35.34a	37.77a	3.92	0.077
Colina (mg/g hígado fresco)	1.52a	1.92bc	1.80ab	1.98bc	2.20c	0.1412	0.0069
Carnitina Total (nmol/g hígado fresco)	114.70a	114.96a	113.08a	116.21a	116.37a	18.25	0.92
*Carnitina Libre (nmol/g hígado fresco)	70.31a	77.30a	87.60a	88.30a	81.94a	9.80	0.60
Acil-Carnitina (nmol/g hígado fresco)	43.63a	37.64a	22.78a	21.76a	41.82a	12.07	0.25
AGL (mg/g hígado fresco)	0.394	0.406	0.380	0.263	0.2932	0.060	0.10

T0: Control. T1: 20 g/d Aminoshure® + 60 g/d Reashure® + 100g/d Fumarato de L-Carnitina.

T2: 20 g/d de Aminoshure® + 60 g/d Reashure® + 200 g/d Fumarato de L-Carnitina.

T3: 120 g/d Reashure® + 100 g/d Fumarato de L-Carnitina.

T4: 120 g/d Reashure® + 200 g/d Fumarato de L-Carnitina.

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

*La inclusión de la covariable producción de leche en la lactancia anterior tuvo efecto significativo en el ajuste del modelo para el análisis de las concentraciones hepáticas de carnitina libre. El coeficiente entre la covariable producción de leche en la lactancia anterior y las concentraciones hepáticas de carnitina libre fue de: -0.0109, indicando que se produjo una disminución de 10.9 nmol/g en las concentraciones hepáticas de carnitina libre conforme aumentó en 1000 kg la producción de leche en la lactancia anterior.

Para las demás variables la inclusión de las covariables condición corporal al inicio del experimento, número de partos y la producción de leche corregida en la lactancia anterior no tuvo efecto significativo ($p > 0.05$).

No se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre periodos de muestreo para las concentraciones hepáticas de triglicéridos, colina, acil-carnitina carnitina libre,

carnitina total y AGL. Sin embargo se observó una fuerte tendencia ($p=0.059$) a que los valores de triglicéridos hepáticos fueran más altos al día 10 preparto. Los resultados se presentan en la tabla 22.

Tabla 22. Medias por periodo de muestreo de las concentraciones hepáticas de triglicéridos, colina, carnitina y ácidos grasos libres (AGL) de vacas Holstein sometidas a diferentes combinaciones de Metionina Colina y Fumarato de L-Carnitina

Variable	10	10	20	E.E	<i>p</i>
	Preparto	Posparto	Posparto		
Triglicéridos (mg/g hígado fresco)	45.39	36.80	40.42	2.49	0.059
Colina (mg/g hígado fresco)	1.89	1.97	1.77	0.077	0.086
Carnitina Total (nmol/g hígado fresco)	129.71	111.84	125.37	16.02	0.18
Carnitina Libre (nmol/g hígado fresco)	89.50	73.89	81.35	6.88	0.27
Acil-Carnitina (nmol/g hígado fresco)	38.57	33.21	31.63	9.78	0.44
AGL (mg/g hígado fresco)	0.375	0.368	0.298	0.033	0.15

EE: máximo valor del error estándar de la media. *p*: probabilidad de cometer el error Tipo I.

8. Discusión y Conclusiones

8.1.1. Discusión experimento 1. Efecto del nivel de complementación con Metionina y Colina

No se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos para la producción de leche y sus contenidos de grasa y proteína, ni respecto a los consumos de materia seca (véase tabla 5), lo que estuvo acorde con otros autores (Zom et al., 2011., Hartwell et al., 2000; Pinotti et al., 2003; Janovick Guretzky et al., 2006. Leiva et al., 2015). Es poco probable que la suplementación con metionina y colina cause efectos significativos sobre el consumo de materia seca y sobre la producción y composición de la leche durante los primeros 20 días postparto, pues durante este periodo ocurre la iniciación de la lactancia, el cual es un proceso coordinado por mecanismos hormonales, los cuales condicionan el flujo de nutrientes hacia la producción lechera (Bauman y currie 1980); luego durante este periodo donde la producción de leche todavía no alcanza valores significativamente altos, es probable que la metionina y colina no sean nutrientes limitantes para la síntesis láctea.

Los tratamientos no tuvieron efecto sobre las concentraciones plasmáticas de AGNES, lo que indica que la suplementación con colina y/o metionina no tuvo efecto sobre la movilización lipídica. Estos resultados están acorde con investigaciones previas (Hartwell et al. (2000), Piepenbrink and Overton (2003), Janovick Guretzky et al. (2006), and Davidson et al. (2008), Leiva et al (2015)).

El objetivo principal de este experimento era determinar si la exportación de triglicéridos hepáticos era sensible al suministro de metionina y colina, para tal efecto se determinaron las concentraciones plasmáticas de triglicéridos. Como se puede observar en la tabla 7 los tratamientos no afectaron las concentraciones plasmáticas de triglicéridos. Solo se encontraron diferencias respecto a la concentración plasmática de β -Hidroxibutirato (BHB), encontrando que el tratamiento control y el tratamiento que recibió suplementación solo con metionina presentaron valores significativamente más bajos. La explicación coherente de estos resultados no radica en el balance nutricional; como se observa en la

tabla 5, los tratamientos no presentaron diferencias significativas respecto a los balances de ENL, PM y PDR. Los valores de AGNES no presentaron diferencias significativas entre tratamientos, al respecto Mc Carthy et al (2015) al realizar un meta análisis de la relación entre AGNES y β -hidroxibutirato encontraron que durante el periodo de transición existe una muy baja correlación entre estas variables. Como se observa en la tabla 8, 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 (véase tabla 8). Estas variaciones ponen de manifiesto que durante el periodo de transición los valores de AGNES no se corresponden directamente con el balance nutricional ni con los valores de BHB, pues al día 10 preparto los animales presentaban balances positivos, y al día 20 posparto no (véase tabla 6). Por el contrario los valores de BHB indican que conforme el animal iniciaba la producción lechera la oxidación de ácidos grasos se hacía mayor y con ello se incrementaban los valores plasmáticos de BHB. La variación en los triglicéridos plasmáticos presentó alta concordancia entre el balance energético preparto y posparto, mostrando disminución significativa durante el posparto, indicando que el cambio en la disponibilidad de nutrientes y en el balance hormonal tiene efectos importantes sobre la síntesis y exportación de triglicéridos desde el hígado.

La concentración hepática de triglicéridos (TG) no fue afectada por la suplementación con metionina y/o colina (véase tabla 9). Sin embargo se observó una tendencia ($p=0.11$) a su disminución en el tratamiento con dosis altas de colina (T3). La concentración de TG estuvo acorde con lo reportado por otros autores (Kalaitzakis et al 2007, Starke et al 2010, Gross et al 2013) y en un rango de clasificación bajo. Los bajos valores de TG hallados se 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 (véase tabla 8), Kalaitzakis et al (2007) 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. 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 triglicéridos hepáticos entre la semana -1 parto (25 mg/g) y la semana +1 posparto (57 mg/g). Estos datos confirman los cálculos de Gonzalez y Koenek (2006) que indican que concentraciones de AGNES superiores a 0.5mM ocasionan una captación de AGNES por el tejido hepático superior a su oxidación, lo que induce un desbalance en favor de su esterificación y su acumulación. Como se anotó anteriormente ese no es el caso de los animales utilizados en el experimento, pues como se observa en la tabla 8, la concentración de AGNES solo tomo valores máximos de 0.23 mM al momento del parto, mientras que en los demás periodos de muestreo (-10 parto, 10 y 20 posparto) los valores de AGNES fueron más bajos y no presentaron variación significativa, lo que se correspondió con la mínima variación de los valores de triglicéridos hepáticos por periodos de muestreo.

Los autores citados han reportado datos obtenidos con vacas alimentadas con una ración total mezclada (TMR). Es de esperarse variaciones importantes respecto a las vacas alimentadas con base en pasturas. Scharen *et al* (2015), encontraron cambios significativos en el consumo de materia seca y en los indicadores metabólicos de la energía cuando gradualmente cambiaron la dieta desde TMR a pastoreo suplementado con ensilaje y concentrado, lo que debe suponer cambios significativos en la síntesis, acumulación y exportación de lípidos por el hígado. Roche *et al* (2015) encontraron 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 posparto. Estos autores encontraron que las vacas con mayor condición corporal al parto presentaron mayor producción de leche y una mayor pérdida de peso, lo que trajo consigo un aumento en la concentración de AGNES, sin embargo el máximo valor de AGNES en las vacas con la mayor restricción alimenticia fue de 0.45 mM, indicando que en este estudio se presentaron valores de AGNES inferiores a los reportados como de riesgo para la acumulación de TG en hígado. Bajo las condiciones de pastoreo como las descritas por Roche *et al* (2015) y como en las que se llevó a cabo la presente investigación es

probable que se presenten pocas condiciones de riesgo para la lipidosis hepática debido al poco reto productivo al que están sometidos los animales; el nivel de producción reportado por Roche *et al* (2015) (entre 22.9 y 24,6 kg/d) es bastante similar al encontrado en la presente investigación (véase tablas 5 y 6). Adicionalmente en Roche *et al* (2015) los efectos de la condición corporal en el parto sobre la pérdida de peso en el posparto no fueron de gran magnitud, debido a que los grupos de vacas evaluadas no presentaron grados de condición corporal extrema, pues solo analizaron vacas con grado 4 y 5 en una escala de 9 puntos, lo que bajo la escala utilizada en esta investigación equivaldría aproximadamente entre 3.0 a 3.5, valores similares a los encontrados en la presente investigación (véase tabla 5) y significativamente diferentes a los reportados en vacas sobre acondicionadas ($CC > 3.75$, Hartwell *et al* (2000)) con excesiva pérdida de peso y elevadas concentraciones de AGNES, lo que fue descrito por Reid *et al* (1986), como el síndrome de engrasamiento hepático, el cual hoy en día se asocia con un síndrome de resistencia a la insulina (De Koester *et al*, 2015).

La baja respuesta en la concentración de triglicéridos hepáticos a las dosis utilizadas de metionina y colina pudo ser debida 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 triglicéridos. 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, esto se evidenció porque no hubo cambios significativos en la concentración de triglicéridos hepáticos entre periodos de muestreo. De este modo durante la fase de balance nutricional positivo (parto) aumentaron significativamente la síntesis hepática de triglicéridos, estos no tuvieron limitantes para ser exportados a la sangre y por ende su nivel plasmático fue más alto durante este periodo, esto permitió que no aumentaron significativamente las concentraciones hepáticas de triglicéridos. 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 β -hidroxibutirato, de tal modo que la disponibilidad de AGNES para reesterificación fue mínima, esto sumado a la disminución significativa de la síntesis de Novo de ácidos grasos debido al balance nutricional negativo, disminuyó significativamente la síntesis hepática de triglicéridos, lo que condujo a una disminución en su exportación a la sangre, que se notó en una disminución significativa en los triglicéridos plasmáticos, lo que permitió que no disminuyeran las concentraciones hepáticas de triglicéridos.

Cooke et al (2007) encontraron 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. Por su parte Zon et al (2011) encontraron que 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; en la semana -3 preparto y 6 posparto cuando las vacas presentaron concentraciones de 27 y 40 mg/g respectivamente, la suplementación fue ineficaz. 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 triglicéridos hepáticos no existen limitantes para su exportación y por lo tanto no se encuentra respuesta a la suplementación con colina.

Se pudo evidenciar que los animales suplementados simultáneamente con metionina y colina presentaron valores más altos de BHB, indicando una mayor oxidación de ácidos grasos en estos animales. La explicación de estos resultados podría basarse en una mayor disponibilidad de carnitina para la incorporación de ácidos grasos a la β oxidación mitocondrial. Se conoce la participación de metionina, y colina como donantes principales de grupos metilos (Emmanuel y Kennedy, 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. Los autores revisados (Zom et al. 2011; Piepenbrink y Overton, 2003; Pinotti et al., 2003; Janovick Guretzky et

al., 2006; Cooke et al., 2007; Davidson et al., 2008, Leiva et al, 2015) no encontraron efectos significativos de la suplementación con colina sobre las concentraciones de BHB. Sin embargo Pinotti et al (2003) y Cooke et al (2007) reportaron una disminución significativa en los valores de AGNES en respuesta a la suplementación con colina, ambos autores sugirieron que la disminución en los valores de AGNES en respuesta a la suplementación con colina pudo ser debida a un incremento en la disponibilidad de carnitina y en la oxidación de ácidos grasos, que condujo a una disminución en la concentración de AGNES. Las diferencias con estos autores pudieron deberse a la cantidad de carbohidratos no estructurales (CNE) en la dieta, se conoce que las dietas basadas en pastoreo son altas en fibra detergente neutra (FDN) y bajas en CNE. Aunque Pinotti et al (2003) y Cooke et al (2007) no reportaron la composición nutricional de las dietas utilizadas, si informaron que fueron basadas en raciones totalmente mezcladas a base de ensilaje de maíz y granos, las cuales contienen el valor mínimo de FDN y valores óptimos de CNE. Estas dietas generan una cantidad importante de propionato que conduce a una mayor disponibilidad de glucosa, esta condición debe permitir que el extra de acetil-CoA producido por el extra de ácidos grasos que ingresan a la β -oxidación mitocondrial, ingresen al ciclo de Krebs y se oxiden completamente, sin la formación adicional de cuerpos cetónicos. Por el contrario un aumento en la β -oxidación mitocondrial en ausencia de una dieta alta en CNE debiera conducir a un aumento significativo en la generación de β -hidroxibutirato, como fue el caso en la presente investigación.

Desafortunadamente ninguna de las investigaciones sobre la suplementación de bovinos con colina ha enfocado esfuerzos en determinar su efecto sobre la síntesis de carnitina. Con el objeto de conseguir elementos para sustentar la hipótesis de que la suplementación con colina conduce a aumentos en la síntesis de carnitina, se determinaron las concentraciones hepáticas de las diferentes formas de carnitina en los diferentes tratamientos (Véase tabla 9). Los valores encontrados estuvieron en el rango reportado por otros autores (Carlson et al 2007a; Carlson et al 2006) 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.

La interacción entre colina y carnitina es poco conocida en bovinos. En los humanos y en las especies animales asociadas a la experimentación bioquímica (ratas y cobayos), se ha logrado conocer algo al respecto. Daily y Sacham (1995) encontraron que en humanos la suplementación con colina aumenta la reabsorción renal de carnitina, lo que origina un mecanismo que estos autores denominaron mecanismo de conservación de carnitina. Para que pueda comprobarse un mecanismo de conservación de carnitina asociado a la colina tendría que probarse que esta promueve su ingreso y almacenamiento a los tejidos. Al respecto estos mismos autores encontraron que la suplementación con colina a cobayos aumento significativamente la concentración plasmática de carnitina libre, su reabsorción renal y sus concentraciones en el músculo, pero no así en los otros tejidos (hígado, cerebro, corazón y riñón), con lo cual concluyeron que la elevación significativa en las concentraciones de carnitina en músculo son la prueba del mecanismo de conservación de carnitina inducido por colina. Estos mismos autores encontraron que las concentraciones plasmáticas de β -hidroxibutirato 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 del mecanismo de conservación de carnitina. Daily y Sacham (1995) estimaron que el mecanismo de conservación de carnitina fue responsable de un tercio del incremento en las concentraciones de carnitina en el músculo en los animales suplementados con colina, el incremento restante fue debido a un aumento en la síntesis de carnitina.

Estos resultados fundamentan la afirmación de que efectivamente en la presente investigación la suplementación con colina pudo aumentar la capacidad de oxidación de ácidos grasos, lo que se evidenció a través del aumento en las concentraciones de β -hidroxibutirato sin que necesariamente se elevaran las concentraciones hepáticas de carnitina, debido posiblemente a que el aumento en la disponibilidad de carnitina no fue tan alto como para afectar su concentración en los tejidos. Adicionalmente se debe considerar 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. Carlson et al (2007a) reportaron que las concentraciones de carnitina en músculo fueron entre 7 y 8 veces mayores a las encontradas en hígado.

Es posible que la suplementación con colina consiga aumentar la capacidad de oxidación de ácidos grasos aun en condiciones de baja disponibilidad de carnitina, Goselink et al (2003), encontraron que la suplementación con colina a vacas durante el periodo de transición aumento significativamente la expresión de *FATP5*, una proteína que facilita el ingreso de los AGNES al hepatocito y de *SLC22A5*, un transportador de membrana que facilita el ingreso de carnitina dentro del hepatocito. Estos autores no encontraron elevación en los valores plasmáticos de β -hidroxibutirato en los animales suplementados, lo que pudo ser debido a una dieta relativamente alta en carbohidratos no estructurales, como se mencionó antes. En bovinos solo existe un reporte (Osorio et al, 2014) acerca del efecto de otros factores lipotrópicos sobre las concentraciones de carnitina, estos autores encontraron que la suplementación con metionina a vacas lecheras durante el periodo de transición aumento significativamente la disponibilidad de carnitina en hígado.

La suplementación con metionina y/o colina no consiguió aumentar las concentraciones hepáticas de colina. Los valores encontrados (entre 1.30 y 1.66 mg/g, véase tabla 9) son relativamente bajos respecto a los reportados por Sato et al (2005), quienes reportaron valores de 2.2 y 2.5 mg/g, y quienes no encontraron diferencias entre vacas sanas y vacas con lipidosis hepática respecto a esta variable. Las diferencias con estos autores puede deberse a un mayor aporte de proteína metabolizable y colina derivadas de una ración totalmente mezclada. En la presente investigación el tratamiento que solo recibió metionina (T1) presentó las concentraciones más bajas de colina, el tratamiento control (T0) presentó concentraciones similares a los tratamientos T2 y T3 los cuales recibieron suplementación con colina y metionina. Esta situación puede estar fundamentada en que bajo las condiciones nutricionales en las que se condujo el experimento la suplementación fue insuficiente para conseguir aumentar significativamente la concentración de colina. Estos resultados están acorde con Osorio et al (2014), quienes no encontraron efecto de la suplementación con metionina sobre las concentraciones hepáticas de colina. Desafortunadamente no se encuentran reportes de la concentración hepática de colina en respuesta a la suplementación con colina.

Una situación relativamente desfavorable para no haber encontrado respuestas en las concentraciones hepáticas de colina pudo estar basada en el balance de proteína metabolizable (PM) y de ENL del tratamiento control (T0) respecto al tratamiento que solo recibió metionina (T1) (véase tabla 5). Mientras que los tratamientos T2 y T3 presentaron balances de ENL y PM numéricamente más cercanos entre sí, el tratamiento control presentó balances de ENL aproximadamente 2,5 veces superior respecto a T2 y T3, pero 4.7 veces superior respecto a T1. Esto originó pérdidas de peso aproximadamente tres veces más grandes en T1 respecto a T0. 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). Si bien no se presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto a estas variables, se puede apreciar que por motivos del azar T0 y T1 pudieron presentar un grado importante de diferencias, lo que pudo favorecer aumentos en la concentración de colina y disminución en la de triglicéridos en T0, y disminución en la concentración de colina y aumento en la de triglicéridos en T1. Esta situación hizo que estas variables fueran similares en T0 respecto a T2 y T3, a su vez que distanció los valores encontrados en T1 de los encontrados en T2 y T3. De especial interés es el hecho de que en T1, el tratamiento con relativamente más bajo balance de PM y ENL se presentaron los valores relativamente más altos de triglicéridos hepáticos, simultáneamente con los valores significativamente más bajos de colina.

Otros autores (Hartwell *et al*, 2000 y Piepenbrink y Overton, 2003) reportaron ausencia de respuesta en las variables de exportación de lípidos desde el hígado a la suplementación con colina cuando las dietas fueron bajas en energía y proteína metabolizable; 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.

8.1.2. Conclusión experimento 1. Efecto del nivel de complementación con Metionina y Colina

Bajo concentraciones relativamente bajas de AGNES y triglicéridos hepáticos, la metionina y colina no son nutrientes limitantes para la exportación de triglicéridos desde el hígado a la sangre, por consiguiente bajo esta condición no se observa lipidosis hepática y como consecuencia la suplementación con metionina y/o colina no ocasiona efectos significativos sobre las concentraciones hepáticas de triglicéridos. Los cambios en el balance energético a través del periodo de transición afectaron significativamente la exportación de triglicéridos a la sangre, estos cambios se correspondieron directamente con cambios en la síntesis hepática de triglicéridos. La suplementación con colina y/o metionina no consiguió aumentar significativamente las concentraciones hepáticas de colina, esta respuesta pudo estar afectada por el balance de proteína metabolizable durante el experimento y por la utilización de colina para la síntesis de otros compuestos, entre ellos carnitina. Se evidenció un aumento significativo en los indicadores de oxidación de ácidos grasos en respuesta a la suplementación con colina, debido posiblemente al efecto conjunto de un aumento en la síntesis de carnitina y a un mecanismo ahorrador de carnitina inducido por colina, descrito previamente en otras especies, sin embargo la información al respecto generada en bovinos es bastante limitada.

Bajo las condiciones en que se desarrolló la investigación la complementación con metionina y/o colina no tuvo beneficios importantes como para implementar su utilización en vacas lecheras durante el periodo de transición a la lactancia.

8.2.1. Discusión experimento 2. Efecto del nivel de complementación con Fumarato de L-Carnitina.

La suplementación con carnitina no afectó el consumo de materia seca, ni la producción de leche y su composición (véase tabla 11), lo que estuvo acorde con LaCount (1996a) y Carlson (2007a). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de AGNES y β -Hidroxibutirato (BHB) a diferentes tiempos de medición (véase tabla 14). Se observa como alrededor del parto los valores de AGNES fueron significativamente más altos, esto es debido a la disminución significativa en el consumo de materia seca que ocurre alrededor del parto conjuntamente con el aumento del cortisol (Weber et al 2013), lo cual induce la movilización de los AGNES desde el tejido adiposo. Los valores de BHB el día 10 preparto y el día del parto fueron significativamente inferiores a los valores encontrados en los días 10 y 20 posparto; esto tiene su explicación dado que conforme avanzan los días en lactancia y aumenta la producción de leche, la vaca presenta mayor déficit de energía y recurre a la oxidación de los AGNES, esto aunado a un déficit creciente de glucosa conlleva a la generación de una mayor cantidad de BHB. La relación entre AGNES y BHB alrededor del parto no se evidenció, debido a que el incremento en la gluconeogénesis inducida por el cortisol durante este periodo (Hammon et al, 2005), incrementó los niveles de glucosa, impidiendo la elevación de los valores de BHB.

Los valores de urea plasmática fueron más altos al día 10 preparto y el día del parto (véase tabla 14). Los valores altos en el periodo preparto se explican por un balance de PDR significativamente más alto (véase tabla 12) durante este periodo (Putnam y Varga, 1998). Los valores más altos alrededor del parto obedecen al intenso catabolismo de los aminoácidos destinados a la gluconeogénesis inducida por cortisol (Hammon et al, 2005), este proceso incrementa la desaminación oxidativa de aminoácidos, lo que genera amonio, el cual en su mayoría es convertido en urea.

Aunque en el presente experimento dentro de sus objetivos no se contempló estudiar los efectos del fumarato de L-carnitina sobre la fermentación ruminal, no se puede desconocer que la suplementación con fumarato de L-Carnitina puede tener efectos sobre

los parámetros de la fermentación ruminal. Se ha reportado que el fumarato tiene efectos sobre la generación de amonio y sobre la proporción molar de ácidos grasos volátiles en el rumen. Asanuma et al (1999) encontraron que la adición de fumarato a microorganismos ruminales *in vitro* aumentó la producción de propionato y disminuyó la producción de metano. Ungerfeld et al (2007), confirmaron estos hallazgos a través de un completo meta análisis. Yu et al (2010) encontraron que en cabras lecheras la suplementación con 6 g/d de fumarato condujo a disminuciones en el amonio ruminal y en la relación acetato/propionato, y a aumentos en las concentraciones de glucosa plasmática, pero sin cambios significativos en las concentraciones de plasmáticas de urea. Debido a que el objetivo primordial de esta investigación radica en los indicadores metabólicos, en este experimento se analizaron los efectos de la suplementación con fumarato de L-Carnitina sobre las concentraciones plasmáticas de glucosa y urea, de tal modo que a través de estas variables se pudiera inferir si el componente fumarato, del fumarato de L-carnitina ocasionó cambios en la fermentación ruminal que afectaron significativamente estos indicadores plasmáticos. La suplementación con fumarato de L-carnitina no afectó las concentraciones plasmáticas de glucosa, pero sí las de urea.

La suplementación con fumarato de L-Carnitina aumentó significativamente las concentraciones plasmáticas de urea (véase tabla 13). Otros autores, LaCount (1996b), Carlson et al (2006), Carlson et al (2007a) no encontraron efecto de la suplementación con carnitina sobre esta variable. La mayor concentración de urea plasmática en los tratamientos que recibieron carnitina pudo ser debida en parte a la alta degradabilidad ruminal del fumarato de L-carnitina. Como se mencionó en la metodología, la degradabilidad de este compuesto fue cercana al 90%, lo que estuvo acorde con LaCount (1996b) quienes reportaron que la degradabilidad *in vitro* de la carnitina fue de 92.9%. Debido a la alta degradabilidad ruminal del fumarato de L-carnitina, se estima que la cantidad disponible de carnitina para su absorción intestinal fue de 5.8 y 11.6 g/día para los tratamientos T1 y T2 respectivamente. Los animales de los tratamientos T1 y T2 recibieron un aporte de carnitina degradable en rumen de aproximadamente 52 y 104 gramos/día. Con un 8.7% de nitrógeno (N) en la carnitina, el aporte de nitrógeno liberado en rumen fue de 4,52 y 9.4 gramos por día, respectivamente. Acorde con Jonker *et al*

(1998), en la medida en que se incremente el consumo de nitrógeno degradable, mayor será la concentración de urea en la sangre. Este N adicional debiera incrementar la síntesis de urea. Sin embargo Carlson (2007a) y LaCount (1996b) también utilizaron dosis altas de L-carnitina con alta degradabilidad ruminal y no reportaron aumentos significativos en la concentración de urea plasmática. Estas cantidades adicionales de nitrógeno degradable en rumen no parecen de gran magnitud como para ser el único factor responsable del incremento significativo en las concentraciones plasmáticas de urea en respuesta a la suplementación con fumarato de L-carnitina.

Chapa et al (1998) reportaron que la administración intravenosa de L-carnitina en ovejas redujo la concentración plasmática de amonio durante la intoxicación inducida por urea, sin embargo cuando Chapa et al (2001) suministraron la carnitina en la dieta, la reducción de la hiperamonemia inducida experimentalmente ocurrió solo en algunos periodos de muestreo. Al respecto la información generada en rumiantes es bastante escasa, pero los resultados parecen indicar un efecto de la L-carnitina sobre la remoción del amonio plasmático, posiblemente debido a su conversión a urea. White et al (2001) suplementaron bovinos en crecimiento con diferentes fuentes proteicas en combinación con carnitina, y encontraron que la suplementación con carnitina disminuyó las concentraciones plasmáticas de amonio en todos los casos, sin embargo las concentraciones plasmáticas de urea solo se incrementaron en 1 de 2 experimentos.

La mayoría del conocimiento generado acerca de los efectos de la carnitina sobre la síntesis de urea ha sido debido al interés en la encefalopatía inducida por hiperamonemia en humanos. Wutzke y Lorenz (2004), encontraron que la suplementación con L-carnitina en humanos no afectó las tasas de proteogénesis ó proteólisis, lo que descarta que la elevación en las concentraciones de urea sean debidas a un aumento en la degradación proteica. Ratnakumari et al (1993), encontraron que la suplementación con carnitina disminuyó las concentraciones hepáticas de amonio en monos con hiperamonemia inducida, estos autores sugirieron un aumento en la actividad del ciclo de la urea por efecto de la carnitina. Takeuchi et al (1988) encontraron que la adición de L-carnitina al medio de cultivo de hepatocitos de rata sometidos a inhibición del ciclo de la urea por

valproato, consiguió eliminar los efectos del valproato, lo que se vio reflejado en un aumento de las cetonas totales y una disminución en las concentraciones de amonio. O'Connor et al (1987a) encontraron que la suplementación con carnitina a monos con hiperamonemia inducida por infusión de acetato de amonio, aumentó significativamente la oxidación de ácidos grasos y el ciclo de krebs. Sus resultados sugirieron que el aumento en estas vías metabólicas puede ser responsable por el incremento significativo observado en la síntesis de urea. O'Connor et al (1987b) reportaron que la hiperamonemia e hipouremia inducida por benzoato de sodio fue debida a una disminución en los niveles de N-acetil glutamato, el activador alostérico de la carbamil-fosfato sintetasa, principal enzima reguladora del ciclo de la urea. Estos autores lograron revertir los efectos del benzoato de sodio con la administración previa de L-carnitina a monos que recibieron benzoato de sodio. Tomomura et al (1996) encontraron que la expresión de las enzimas claves del ciclo de la urea carbamil-fosfato sintetasa y argininosuccinato sintetasa inducida por glucocorticoides fue inhibida por la adición de ácidos grasos de más de 16 carbonos en el medio de cultivo de hepatocitos de rata. Por el contrario la adición de estos ácidos grasos incrementó la expresión de enzimas claves de gluconeogénesis. Tomomura et al (1996) informaron que resultados similares fueron observados en el hígado de monos con esteatosis visceral, y concluyeron que el incremento de ácidos grasos de cadena larga en el hígado es responsable de la disminución en la expresión de enzimas del ciclo de la urea. Estos resultados están acorde con Malaguarnera (2013), quien indicó que la disminución en el sistema de transporte de ácidos grasos dependiente de carnitina ocasiona una acumulación de moléculas de acil-CoA en el citosol, y que estos metabolitos inhiben el ciclo de la urea.

La información disponible permite inferir que los mecanismos por los que la carnitina aumenta la síntesis de urea ocurren a varios niveles: expresión de enzimas, cambios en la actividad enzimática, cambios en la concentración de efectores alostéricos, disminución en la concentración de acil-Coa; sin embargo es imposible identificar cuál de estos mecanismos es el que opera bajo determinadas condiciones. Las evidencias presentadas sugieren que en la presente investigación, el aumento en la síntesis de urea en respuesta a la suplementación con fumarato de L-carnitina fue el efecto conjunto de una mayor

disponibilidad de amonio en los animales suplementados, debido a la alta degradabilidad del fumarato de carnitina, y a un aumento significativo en la actividad del ciclo de la urea inducida por la L-carnitina.

Se observó una baja tendencia ($p=0.16$) al incremento en las concentraciones de β -Hidroxiacetato (BHB) en los tratamientos que recibieron fumarato de L-carnitina (véase tabla 13). Estos resultados coinciden con Carlson et al (2007a) quienes encontraron que las concentraciones de B-OH butirato tendieron ($P=0.07$) a ser más altas en vacas que recibieron 10 y 20 gramos de carnitina disponible para su absorción intestinal. Erfle et al (1971), reportaron que en vacas con cetosis, seguidamente después de la infusión de carnitina a la sangre se aumentaron significativamente las concentraciones sanguíneas de cetonas totales, estos autores concluyeron que estas variaciones daban cuenta de un aumento en la oxidación de ácidos grasos. El incremento de las cetonas totales fue interpretado como un exceso de su producción respecto a su utilización, en respuesta a la infusión de carnitina. Estos autores concluyeron además que el grado de producción de cetonas en respuesta a carnitina depende de la disponibilidad de carbohidratos: *“Cuando el suministro de carbohidratos (es decir, precursores de oxalacetato) es adecuado para el ciclo de Krebs, la carnitina puede tener un efecto ahorrador de hidratos de carbono mediante el aumento de la oxidación completa de ácidos grasos, tanto en el músculo, como en el hígado. Con el agotamiento del oxaloacetato hepático la acción principal de la carnitina es un incremento en la oxidación de ácidos grasos libres en el hígado, donde, debido a la función alterada del ciclo de Krebs, esto resulta en tasas mayores de cetogénesis que a su vez dan lugar a un aumento en la concentración de cetonas plasmáticas”*.

En la presente investigación la elevación en las concentraciones de β -hidroxiacetato (BHB) no fue tan evidente, debido posiblemente a una mayor cantidad de glucosa disponible, de tal modo que el efecto en el aumento de la oxidación de ácidos grasos pudo ser significativo, pero sin cambios muy aparentes en las concentraciones de BHB. En el experimento 1 se fundamentó que la elevación de los valores plasmáticos de BHB en los animales suplementados con colina, obedeció a un mecanismo ahorrador de carnitina,

conjuntamente con un aumento en su síntesis, si se comparan los balances energéticos de ambos experimentos (véase tabla 5 y tabla 11), se encuentra que efectivamente los animales del experimento 1 presentaron balances relativamente más bajos que los del experimento 2 (-2.46 y -2.33 VS -0.65 y 1.39 Mcal ENL/día), de tal modo que la diferencias encontradas respecto a la variable BHB pueden deberse a una mayor disponibilidad de glucosa, pues mientras en el experimento 1 los valores de BHB ascendieron paulatinamente desde 0.70 a 1.21 mmol/l entre el día 10 preparto al 20 posparto, en el experimento 2 durante este mismo periodo el aumento fue de 0.69 a 0.93 mmol/l (véase tabla 8 y tabla 14).

La suplementación con fumarato de L-carnitina no afectó significativamente las concentraciones de AGNES (véase tabla 13). Estos resultados concuerdan con LaCount (1996a) y Carlson et al (2007a). Es de esperarse que la suplementación con carnitina no afecte las concentraciones plasmáticas de AGNES, dado que el proceso que da a origen al aumento de los AGNES plasmáticos es el proceso de lipólisis, el cual se conoce que es regulado a través de mecanismos hormonales con la participación de las hormonas insulina, glucagón y cortisol (Lomax et al, 1979).

La concentración de triglicéridos hepáticos (véase tabla 15 y tabla 16) estuvo acorde con lo reportado por otros autores (Kalaitzakis et al 2007, Starke et al 2010, Gross et al 2013) y en un rango de clasificación bajo según Kalaitzakis et al (2007). Como ya se discutió en el experimento 1, Los bajos valores de TG hallados se 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 0.109 y 0.245 mM a lo largo de los periodos de muestreo, Kalaitzakis et al (2007) 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 lipidosis con valores de AGNES superiores a 0.25 mM. Por su parte Gross et al (2013), reportaron valores de AGNES de 0.23 y 0.78 mM para las semanas -1 preparto y +1 posparto respectivamente, que se correspondieron con cambios significativos en la concentración de triglicéridos hepáticos entre la semana -1 preparto (25 mg/g) y la semana +1 posparto (57 mg/g). Estos datos confirman los

cálculos de Gonzalez y Koenekan (2006), que indican que concentraciones de AGNES superiores a 0.5mM ocasionan una captación de AGNES por el tejido hepático superior a su oxidación, lo que induce un desbalance en favor de su esterificación y su acumulación. Como se anotó anteriormente ese no es el caso de los animales utilizados en el experimento, pues como se observa en la tabla 14, la concentración de AGNES solo tomo valores máximos de 0.245 mM al momento del parto, mientras que en los demás periodos de muestreo (-10 preparto, 10 y 20 posparto) los valores de AGNES no presentaron variación significativa, lo que se correspondió con la mínima variación en los valores de triglicéridos hepáticos por periodos de muestreo (véase tabla 16).

La suplementación con 200 g/día de fumarato de L-carnitina disminuyó significativamente las concentraciones de triglicéridos hepáticos (véase tabla 15). El efecto de la suplementación con carnitina en la disminución de los triglicéridos hepáticos fue debido posiblemente a una mayor tasa de oxidación de ácidos grasos por el hígado, lo que disminuyó la disponibilidad de estos para su esterificación. Esta situación sugiere que aun a bajas captaciones de AGNES por el hígado, su oxidación puede optimizarse. Al respecto Erfle et al (1971), concluyeron que: *“los efectos de la infusión de carnitina en vacas lecheras indican que la oxidación de ácidos grasos en estos animales es un proceso que funciona a valores muy alejados de su pico máximo de eficiencia”*. Drackley et al (1991b) encontraron que en cortes de hígado de vacas durante la lactancia temprana, la carnitina aumentó la oxidación total de palmitato y disminuyó su esterificación. Carlson et al (2007a), suministraron 12, 100 y 200 g/d de un producto no protegido de la degradación ruminal con un 50% de L-carnitina y una degradabilidad ruminal del 80%, a vacas durante el periodo de transición y la lactancia temprana, con lo cual consiguieron 1.2, 10 y 20 g de carnitina disponible para su absorción intestinal. Estas dosis disminuyeron la concentración de triglicéridos hepáticos, cabe destacar que los valores de triglicéridos hepáticos reportados por estos autores para el tratamiento control se encontraban en el rango de clasificación bajo, lo que confirma el efecto de la L-carnitina aún a bajos valores de TG hepáticos. Aunque no se afectaron las concentraciones plasmáticas de AGNES, una tendencia en el aumento en los valores plasmáticos de β -hidroxibutirato en los tratamientos que recibieron 10 y 20 gramos de L-Carnitina fue interpretada por estos

autores como un aumento en las cantidades de AGNES que fueron convertidos a β -hidroxibutirato, más que a triglicéridos. Al respecto Bremer et al (1978), reportaron que en células hepáticas de rata la distribución de los ácidos grasos entre esterificación u oxidación fue regulada por las concentraciones citoplasmáticas de glicerol-fosfato o carnitina, respectivamente.

Las concentraciones hepáticas de las diferentes formas de carnitina fueron más bajas (véase tabla 15 y tabla 16) que las reportadas por otros autores (Erflé et al 1973, LaCount et al 1995, Carlson 2007a, Carlson et al 2007b). La suplementación con fumarato de L-carnitina no afectó las concentraciones hepáticas de las diferentes formas de L-carnitina. Los autores revisados encontraron incrementos en la concentración hepática de carnitina libre y no en las demás formas de carnitina en respuesta a la suplementación con L-carnitina. Carlson et al (2007a), consiguieron aumentar las concentraciones hepáticas de carnitina cuando suministraron dosis superiores a 10g/día de carnitina disponible para absorción intestinal, a dosis inferiores la carnitina no tuvo efecto sobre esta variable. Carlson et al (2007b) previamente ya habían confirmado que la infusión abomasal de 20 g/día de carnitina aumentó significativamente las concentraciones hepáticas de carnitina. Las diferencias respecto a estos autores pueden deberse a la dosis de carnitina disponible para su absorción intestinal y al estado de reservas musculares de carnitina.

Como ya se indicó antes, en la presente investigación las dosis de carnitina estimadas para su absorción intestinal fueron 5.8 y 11.6 g/día para los tratamientos T1 y T2 respectivamente, estas dosis son más bajas que las reportadas por Carlson et al (2007a) y Carlson et al (2007b), de igual modo las concentraciones hepáticas de carnitina fueron más bajas que las reportadas por estos autores. Si bien en la presente investigación no se determinaron las concentraciones musculares de carnitina, es de suponer que estos animales contaban con un nivel relativamente más bajo en las reservas de carnitina respecto a las investigaciones citadas. En otras especies ha sido caracterizado el sistema de transporte de carnitina en hígado. El ingreso de carnitina al hígado depende de concentraciones relativamente altas de carnitina en sangre, ya que según Ramsay et al (2001), la carnitina puede ingresar al hígado por difusión pasiva, y adicionalmente según

Christiansen y Bremer (1976) por un transportador que posee un alto K_m para carnitina ($K_m = 5.6 \text{ mM}$), y muy bajo para butirobetaina ($K_m = 0.5 \text{ mM}$) el precursor plasmático de carnitina. De este modo el hígado capta carnitina de la sangre cuando su concentración se eleva significativamente, debido a la baja afinidad de su transportador por la carnitina, y capta butirobetaina plasmática aun a bajas concentraciones. Esto da cuenta del papel principal del hígado más como productor de carnitina que como acumulador de la misma. Por el contrario el sistema de transporte muscular de carnitina exhibe una afinidad alta para carnitina (Tamai et al, 1998). En la presente investigación las bajas dosis de carnitina disponible para su absorción intestinal no aumentaron las concentraciones plasmáticas de carnitina como para conseguir un incremento significativo de su ingreso al hígado, por lo que no se consiguió elevar su concentración.

Es muy probable que la respuesta a la suplementación con carnitina dependa del nivel de reservas de la misma. LaCount et al (1995), encontraron que vacas en la lactancia temprana que recibieron infusión abomasal o ruminal de carnitina aumentaron significativamente las concentraciones de carnitina libre en hígado y sangre, pero no en el músculo. De igual forma estas vacas aumentaron significativamente la excreción renal de carnitina. Cabe destacar que las concentración de carnitina total en hígado del grupo control reportada por estos autores fue significativamente más alta (258 nmol/g y 300nmol/g, control vs animales experimentales) que la reportada por los demás autores revisados, lo cual pudo condicionar que estos autores no encontraran respuesta en la concentración de triglicéridos hepáticos, ni en las concentraciones musculares de carnitina, ya que estos animales exhibían una especie de saturación de reservas de carnitina, que les indujo aumentos en su excreción renal, de este modo el exceso debió eliminarse en la orina. LaCount (1996a), confirmaron que la infusión abomasal de carnitina aumentó las concentraciones de carnitina en sangre y su excreción urinaria. Este mecanismo puede ser necesario para evitar la acumulación exagerada de carnitina. Aunque se desconocen los mecanismos de control de la excreción renal de carnitina en bovinos, en otras especies como humanos y animales de laboratorio, existe alguna información. Rebouche y Mack (1984) encontraron que el suministro de carnitina dietaría redujo 52% la tasa de reabsorción renal de carnitina. Estos autores indican que la

regulación del transporte renal de carnitina puede prevenir la acumulación excesiva y potencialmente toxica de L-carnitina en las células tubulares renales.

8.2.2. Conclusión experimento 2. Efecto del nivel de complementación con Fumarato de L-Carnitina

La suplementación con 200 gramos/día de fumarato de L-carnitina aportó cerca de 11.6 gramos de carnitina para su absorción intestinal. Aún a bajas concentraciones de AGNES y de triglicéridos hepáticos esta dosis consiguió disminuir significativamente la concentración hepática de triglicéridos. El mecanismo de disminución de triglicéridos hepáticos en respuesta a la suplementación con carnitina fue debido posiblemente al aumento de la oxidación de ácidos grasos. La suplementación con fumarato de L-carnitina aumentó significativamente la síntesis de urea, posiblemente a través de la estimulación del ciclo de la urea a varios niveles. Las bajas dosis de carnitina disponibles para su absorción intestinal no consiguieron aumentar significativamente las concentraciones hepáticas de carnitina, esto debido a la baja afinidad del sistema hepático de captación de carnitina en relación a los demás tejidos.

Aunque una dosis de 200 gramos/día de fumarato de L-carnitina disminuyó significativamente la concentración hepática de triglicéridos, bajo las condiciones en las que se realizó la investigación su uso no se justifica, pues la concentración hepática de triglicéridos en los animales no complementados con fumarato de L-Carnitina estuvo en el rango clasificada como baja, y por lo tanto la acumulación de triglicéridos en el hígado de estos animales no es un problema que deba ser resuelto.

8.3.1. Discusión experimento 3. Efecto de la complementación con diferentes combinaciones de Metionina, Colina y Fumarato de L-carnitina.

No se presentaron diferencias significativas entre tratamientos para la producción de leche y sus contenidos de grasa y proteína, ni respecto a los consumos de materia seca (véase tabla 17), lo que estuvo acorde con otros autores (Zom et al., 2011; Hartwell et al., 2000; Pinotti et al., 2003; Janovick Guretzky et al., 2006; Leiva et al., 2015; LaCount 1996a y Carlson et al, 2007a), quienes reportaron que la suplementación con colina ó carnitina no tuvo efecto sobre estas variables.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración plasmática de AGNES, β -Hidroxibutirato (BHB) y triglicéridos en los diferentes tiempos de medición (véase tabla 20). Se observa como alrededor del parto los valores de AGNES fueron significativamente más altos, esto es debido a la disminución drástica en el consumo de materia seca que ocurre alrededor del parto, y al aumento en la secreción de cortisol (Weber et al 2013), los cuales inducen la movilización de los AGNES desde el tejido adiposo. Las concentraciones de BHB a los 10 días preparto y el día del parto fueron más bajas que los valores encontrados a los días 10 y 20 posparto, esto tiene su explicación en el hecho que conforme avanzan los días en lactancia y aumenta la producción de leche, la vaca presenta mayor déficit de energía y recurre a la oxidación de los AGNES, esto aunado a un déficit creciente de glucosa conlleva a la generación de una mayor cantidad de β -hidroxibutirato. Lo anterior es coherente con los valores de triglicéridos en el periodo preparto, los cuales fueron significativamente más altos, indicando una condición nutricional más favorable durante este periodo.

Los valores de AGNES fueron más bajos en los tratamientos que recibieron dosis altas de carnitina (T2: metionina + dosis baja de colina + dosis alta de carnitina y T4: dosis alta de colina + dosis alta de carnitina) respecto a los tratamientos que recibieron dosis bajas de carnitina (T1: metionina + dosis baja de colina + dosis baja de carnitina y T3: dosis alta de colina + dosis baja de carnitina). Sin embargo el tratamiento control (T0) no fue significativamente diferente a ninguno de estos tratamientos (véase tabla 19).

A simple vista podría decirse que la suplementación con altas dosis de carnitina sin importar la combinación con los otros factores lipotrópicos disminuyó las concentraciones plasmáticas de AGNES. Sin embargo los valores de AGNES del tratamiento control (T0) indican que otros factores influyeron sobre esta variable. El factor adicional que puede explicarlo radica en el balance de proteína metabolizable (PM) (véase tabla 17). El tratamiento control presentó un balance de PM relativamente mayor respecto a los demás tratamientos (101.91 g/d), lo que hizo que las concentraciones de AGNES se acercarán más a los tratamientos suplementados con combinaciones que contenían altas dosis de carnitina (T2 y T4), estos tratamientos presentaron balances de PM (19.31 y 44.20 g/d, respectivamente) más cercanos al tratamiento control y más alejados de los tratamientos con combinaciones bajas de carnitina (-2.24 g/d, para T1, y -50.64 g/d, para T3). De este modo es muy probable que los efectos del balance de PM alteraran la respuesta en las concentraciones de AGNES en los diferentes tratamientos. Hartwell et al (2000), Piepenbrink y Overton (2003), Janovick Guretzky et al (2006), Davidson et al. (2008), Leiva et al (2015), no encontraron efecto de la suplementación con metionina y/o colina sobre las concentraciones plasmáticas de AGNES. Del mismo modo LaCount (1996a) y Carlson et al (2007a) no encontraron efecto de la suplementación con carnitina sobre las concentraciones plasmáticas de AGNES. Es de esperarse que la suplementación con metionina y/o colina y/o carnitina no afecten las concentraciones plasmáticas de AGNES, dado que el proceso que da a origen al aumento de los AGNES plasmáticos es el proceso de lipólisis, el cual se conoce que es regulado a través de mecanismos hormonales con la participación de las hormonas insulina, glucagón y cortisol (Lomax *et al*, 1979).

El tratamiento control (T0) y el tratamiento T1 (metionina+ dosis baja de colina+ dosis baja de carnitina) presentaron concentraciones plasmáticas de triglicéridos significativamente más altas (véase tabla19). Las concentraciones plasmáticas de triglicéridos se relacionaron con el cambio en el balance nutricional entre los periodos de muestreo, sin embargo los tratamientos T0 y T1 no fueron los más cercanos entre sí respecto al balance nutricional, lo que indica que las concentraciones significativamente más altas fueron debidas a los efectos del tratamiento. De este modo los tratamientos que recibieron una combinación de carnitina y colina, en la que al menos una de estas se ofreció en dosis

altas, presentaron valores de triglicéridos plasmáticos significativamente más bajos. Los triglicéridos plasmáticos están constituidos por la fracción transportada por las VLDL, cuyo origen es de síntesis hepática, y por la fracción transportada por los quilomicrones, cuyo origen es la absorción intestinal (Bauchart,1993), acorde con lo anterior, si los animales recibieron dietas con cantidades similares de lípidos, la disminución en los triglicéridos plasmáticos fue debida a la disminución en los triglicéridos exportados a la sangre desde el hígado, esta disminución pudo ser debida a una reducción de la síntesis hepática, o a una disminución en su exportación; en el primer caso las concentraciones hepáticas de triglicéridos no cambiarían o tenderían a disminuir, y en el segundo se incrementarían. Lo observado fue una tendencia en la disminución en la concentración de triglicéridos hepáticos, por lo que se concluye que la disminución en los triglicéridos plasmáticos en T2, T3 y T4 fue debida a una disminución en su síntesis hepática.

El aumento significativo de las concentraciones plasmáticas de β -hidroxibutirato en los tratamientos T2, T3 y T4 (véase tabla 19) indican que en estos se incrementó significativamente la oxidación de ácidos grasos, este incremento restó ácidos grasos para la formación hepática de triglicéridos, debido a esto se disminuyó significativamente su exportación a la sangre, confirmando el origen de la disminución de los triglicéridos plasmáticos. El hecho de que las concentraciones de triglicéridos en sangre e hígado se vieron afectadas por la cantidad de ácidos grasos disponibles para la síntesis hepática de triglicéridos y no por su exportación a la sangre, indica que la suplementación con metionina, colina y fumarato de L-carnitina en cualquiera de sus combinaciones no afectaron la formación de moléculas transportadoras de triglicéridos desde el hígado a la sangre.

El aumento en las concentraciones plasmáticas de β -hidroxibutirato en los tratamientos que recibieron dosis altas de colina y/o carnitina (T2, T3, y T4) es un indicador del incremento de la oxidación de ácidos grasos bajo condiciones de baja disponibilidad de carbohidratos no estructurales (Erfle et al, 1971). Este comportamiento ya fue documentado en el experimento 1. En el experimento 2 solo se observó una tendencia al incremento en las concentraciones de β -Hidroxibutirato (BHB) en los tratamientos

suplementados con fumarato de L-carnitina. Como ya se mencionó previamente, las diferencias entre experimentos respecto a la concentración de BHB obedecen a diferencias en la disponibilidad de carbohidratos no estructurales. El incremento en las concentraciones de β -hidroxibutirato en animales suplementados con colina o carnitina fue descrito por otros autores como un indicador de aumento en la oxidación de ácidos grasos debido a una mayor disponibilidad de carnitina (Carlson et al, 2007a); a un incremento en su síntesis y conservación (Daily y Sacham, 1995), y aun aumento en la captación de AGNES y de carnitina por el hígado de los animales suplementados con colina (Goselink et al, 2003).

Se concluye que la disminución en las concentraciones plasmáticas de triglicéridos y el aumento en las concentraciones plasmáticas de β -hidroxibutirato (véase tabla 19) en los tratamientos T2, T3 y T4 fue debido a un incremento en la oxidación de ácidos grasos por el hígado, lo que coincide con una tendencia ($p=0.1$) a la disminución en la concentración de ácidos grasos libres en hígado en los tratamientos T3 y T4. Este incremento en la oxidación de ácidos grasos originó una tendencia ($p=0.077$) a la disminución en las concentraciones de triglicéridos hepáticos en estos tratamientos (véase tabla 21).

La concentración de triglicéridos hepáticos (véase tabla 21 y tabla 22) estuvo acorde con lo reportado por otros autores (Kalaitzakis et al 2007, Starke et al 2010, Gross et al 2013) y en un rango de clasificación bajo. Los bajos valores de triglicéridos hepáticos se 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 0.105 y 0.23 mM a lo largo de los periodos de muestreo (véase tabla 20), Kalaitzakis et al (2007) 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 lipidosis con valores de AGNES superiores a 0.25 mM. Por su parte Gross et al (2013), reportaron valores de AGNES de 0.23 y 0.78 mM para las semanas -1 preparto y +1 posparto respectivamente, que se correspondieron con cambios significativos en la concentración de triglicéridos hepáticos entre la semana -1preparto (25 mg/g) y la semana +1 posparto (57 mg/g). Estos datos confirman los cálculos de Gonzalez y Koenekan

(2006) que indican que concentraciones de AGNES superiores a 0.5mM ocasionan una captación de AGNES por el tejido hepático superior a su oxidación, lo que induce un desbalance en favor de su esterificación y su acumulación. Como se anotó anteriormente ese no es el caso de los animales utilizados en el experimento, pues como se observa en la tabla 20, la concentración de AGNES solo tomo valores máximos de 0.229 mM al momento del parto, mientras que en los demás periodos de muestreo (-10 preparto, 10 y 20 posparto) los valores de AGNES no presentaron variación significativa (véase tabla 20), lo que se correspondió con variaciones poco significativas en los valores de triglicéridos hepáticos por periodos de muestreo (véase tabla 22). Sin embargo la concentración de triglicéridos hepáticos tendió ($P=0.059$) a ser más alta al día 270 de gestación, debido probablemente a una mayor síntesis hepática de triglicéridos, pues como se observa en la tabla 18, el balance nutricional fue significativamente más alto durante este periodo. Es de resaltar que en los experimentos 1 y 2 no se observó una tendencia al aumento en las concentraciones de triglicéridos hepáticos durante el periodo preparto, lo que pudo deberse a un balance energético relativamente más bajo en estos experimentos, respecto al experimento 1, durante este periodo. Mientras que en el experimento 3 el balance de energía neta de lactancia fue de 6.61 Mcal/día, para el experimento 1 y 2 fue de 2.83 y 4.64 Mcal/día respectivamente.

Cooke et al (2007), encontraron 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. Por su parte Zon et al (2011) encontraron que 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. 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 triglicéridos hepáticos no existen limitantes para su exportación y por lo tanto no se

encuentra respuesta a la suplementación. La baja respuesta en los indicadores de exportación lipídica desde el hígado pudo ser debida a que con bajos niveles de engrasamiento hepático, metionina y colina no son limitantes para la formación de moléculas transportadoras y por lo tanto su suplementación no originó cambios en las concentraciones hepáticas y plasmáticas de triglicéridos.

La complementación con diferentes combinaciones de metionina, colina y fumarato de L-carnitina aumentó significativamente las concentraciones hepáticas de colina acorde con las dosis utilizadas (véase tabla 21). Los valores encontrados (entre 1.52 y 2.20 mg/g) son relativamente bajos respecto a los reportados por Sato et al (2005), si se tiene en cuenta que los valores reportados por éstos (entre 2.2 y 2.5 mg/g) corresponden a animales no suplementados con colina. Las diferencias con estos autores puede deberse a un mayor aporte de proteína metabolizable y colina derivadas de una ración totalmente mezclada. Respecto al experimento 1, en donde solo se complementó con metionina y colina, y no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones hepáticas de colina, se puede concluir que la complementación adicional con carnitina aumentó significativamente las concentraciones hepáticas de colina. Esto puede tener su explicación en la participación de metionina, y colina como donantes principales de grupos metilos (Emmanuel y Kennedy, 1984), y la importancia de estos en la síntesis de carnitina (Daily y Sachan, 1995). Carter y Frenkel (1978), determinaron que en ratas con deficiencia de colina, la suplementación con otros donadores de metilo diferentes a colina (betaina, metionina y sarcosina) fue ineficaz en restablecer las concentraciones tisulares de carnitina; esto comprueba el papel principal de la colina en la síntesis de carnitina. De este modo en la presente investigación la suplementación adicional con carnitina disminuyó la utilización de colina en la síntesis de carnitina, con lo que se consiguió una mayor concentración de colina en hígado.

Las concentraciones hepáticas de las diferentes formas de carnitina (véase tabla 21 y tabla 22) fueron más bajas que las reportadas por otros autores (Erflé et al 1973, LaCount et al 1995, Carlson 2007a, Carlson et al 2007b). La suplementación con las diferentes combinaciones de metionina, colina y fumarato de L-carnitina no afectó las

concentraciones hepáticas de las diferentes formas de L-carnitina (véase tabla 21). Los autores revisados encontraron incrementos en la concentración hepática de carnitina libre y no en las demás formas de carnitina en respuesta a la suplementación con L-carnitina. Carlson et al (2007a), consiguieron aumentar las concentraciones hepáticas de carnitina cuando suministraron dosis superiores a 10g/día de carnitina disponible para absorción intestinal, a dosis inferiores la carnitina no tuvo efecto sobre esta variable. Carlson et al (2007b) previamente ya habían confirmado que la infusión abomasal de 20g/día de carnitina conseguía aumentar significativamente las concentraciones hepáticas de carnitina. Las diferencias respecto a estos autores pueden deberse a la dosis de carnitina disponible para su absorción intestinal, como ya se indicó antes, en la presente investigación, las dosis de carnitina estimadas para su absorción intestinal fueron 5.8 y 11.6 g/día para los tratamientos con dosis bajas (T1 y T3) y para los tratamientos con dosis altas (T2 y T4) de carnitina respectivamente, estas dosis son más bajas que las reportadas por Carlson et al (2007a) y Carlson et al (2007b).

Como ya se mencionó en el experimento 2, el aumento significativo de la captación de carnitina por el hígado requiere de concentraciones plasmáticas relativamente altas de carnitina, debido a la baja afinidad del transportador específico para este tejido (Christiansen y Bremer, 1976). De este modo las dosis utilizadas de carnitina no consiguieron elevar su concentración plasmática como para conseguir una captación significativa por el tejido hepático. Una constante en los tres experimentos desarrollados fue la mínima variación en las concentraciones de carnitina en hígado en respuesta a los diferentes tratamientos. No se puede desconocer que a diferencia de los experimentos 1 y 2, el experimento 3 utilizó conjuntamente los tres factores lipotrópicos, por lo que se esperaba un incremento en las concentraciones hepáticas de carnitina, sin embargo esto nunca se observó. Como ya se indicó previamente en el experimento 2, los modestos incrementos en las concentraciones plasmáticas de carnitina originados por dosis bajas de carnitina posiblemente aumentaron en mayor grado la captación muscular, más que la hepática, debido a la mayor afinidad del sistema de transporte específico para el músculo (Tamai et al, 1998). Otros autores han destacado el papel del hígado más como productor que como acumulador de carnitina. Carlson et al (2007b) concluyeron que la carnitina de

síntesis endógena puede ser utilizada por el musculo y ser secretada en la leche más que acumulada en el hígado, por lo que el incremento de las concentraciones hepáticas requiere de dosis suplementarias relativamente altas.

Es importante destacar que en el experimento 1, donde solo se suplementó con metionina y/o colina se observaron incrementos en las concentraciones de β -hidroxibutirato, al parecer por un aumento en la síntesis de carnitina, sin embargo la suplementación con metionina y/o colina no consiguió aumentar significativamente las concentraciones hepáticas de colina ni de carnitina (véase tabla 9). En el experimento 3, la complementación con los tres factores lipotrópicos (metionina, colina y carnitina) no consiguió aumentar las concentraciones hepáticas de carnitina, pero si aumento significativamente las de colina (véase tabla 21). Esta situación indica que ante la suplementación con carnitina la utilización de colina para la síntesis de carnitina disminuyó significativamente, con lo que se consiguió aumentar la disponibilidad hepática de colina; pero también indica que la síntesis endógena de carnitina disminuye significativamente con la suplementación con carnitina. Esto sugiere un mecanismo de retroalimentación negativa en la síntesis de carnitina. En bovinos no existen reportes de los efectos de la suplementación con carnitina sobre su síntesis endógena. En ratas, Rebouche (1983), encontró que la suplementación con carnitina redujo significativamente la biosíntesis de carnitina a partir de ϵ -N-trimetil-L-lisina, este autor indicó que la disminución en la síntesis de carnitina fue debida al efecto conjunto de la inhibición de la actividad de la γ -butirobetaina hidroxilasa, y a la inhibición del transporte hepático de γ -butirobetaina (un precursor de carnitina). Debido a esto es poco probable que la suplementación conjunta con los tres factores lipotrópicos consiguiera aumentar significativamente las concentraciones hepáticas de carnitina.

8.3.2. Conclusión experimento 3. Efecto de la complementación con diferentes combinaciones de Metionina, Colina y Fumarato de L-Carnitina.

La suplementación con una combinación de carnitina y colina, en la que al menos una de estas se ofreció en dosis altas (30 gramos de colina y 11.6 gramos de carnitina absorbibles en intestino) disminuyó la síntesis hepática de triglicéridos, lo que se evidenció a través

de una disminución significativa en la concentración plasmática de triglicéridos y en una fuerte tendencia a la disminución en las concentraciones de triglicéridos y de ácidos grasos libres en hígado. El aumento significativo de las concentraciones plasmáticas de β -hidroxibutirato indica un incremento significativo en la oxidación de ácidos grasos, que restó ácidos grasos para la formación hepática de triglicéridos, siendo este el mecanismo responsable de los cambios observados. La suplementación con metionina, colina y fumarato de L-carnitina en cualquiera de sus combinaciones no afectaron el mecanismo de transporte de triglicéridos desde el hígado a la sangre, debido a que a bajas concentraciones de triglicéridos hepáticos este mecanismo no es limitante. La complementación con los tres factores lipotrópicos (metionina, colina y carnitina) aumentó significativamente las concentraciones hepáticas de colina, pero no así las de carnitina, indicando que se presentó una disminución significativa en la utilización de colina en la síntesis de carnitina, debido a una disminución en la síntesis endógena de carnitina en respuesta a la suplementación con carnitina.

Bajo las condiciones en que se desarrolló la investigación la complementación con metionina, colina o carnitina no tuvo beneficios importantes como para implementar su utilización en vacas lecheras durante el periodo de transición a la lactancia.

9. Conclusión General

Bajo concentraciones relativamente bajas de AGNES y triglicéridos hepáticos, la metionina y colina no son nutrientes limitantes para la exportación de triglicéridos desde el hígado a la sangre, por consiguiente bajo esta condición no se observa lipodosis hepática y como consecuencia la suplementación con metionina y/o colina no ocasiona efectos significativos sobre las concentraciones hepáticas de triglicéridos. La suplementación con colina y/o metionina no consiguió aumentar significativamente las concentraciones hepáticas de colina, debido a la utilización de colina para la síntesis de otros compuestos, entre ellos carnitina. Se evidenció un aumento significativo en los indicadores de oxidación de ácidos grasos en respuesta a la suplementación con colina, debido posiblemente al efecto conjunto de un aumento en la síntesis de carnitina y a un mecanismo ahorrador de carnitina inducido por colina, descritos previamente en otras especies, sin embargo la información al respecto generada en bovinos es bastante limitada. Aún a bajas concentraciones de AGNES y de triglicéridos hepáticos la suplementación con dosis adecuadas de carnitina consiguió disminuir significativamente la concentración de triglicéridos hepáticos. El mecanismo de disminución de triglicéridos hepáticos en respuesta a la mayor disponibilidad de carnitina fue debido posiblemente al aumento de la oxidación de ácidos grasos. Las dosis de carnitina disponibles para su absorción intestinal no consiguieron aumentar significativamente las concentraciones hepáticas de carnitina, esto debido a la baja afinidad del sistema hepático de captación de carnitina en relación a los demás tejidos. La complementación con los tres factores lipotrópicos (metionina, colina y carnitina) aumentó significativamente las concentraciones hepáticas de colina, pero no así las de carnitina, indicando que se presentó una disminución significativa en la utilización de colina en la síntesis de carnitina, debido a una disminución en la síntesis endógena de carnitina en respuesta a la suplementación con carnitina.

Bajo las condiciones en que se desarrolló la investigación la complementación con metionina, colina o carnitina no tuvo beneficios importantes como para implementar su utilización en vacas lecheras durante el periodo de transición a la lactancia.

10. Anexos. Medias por periodo de muestreo para cada tratamiento en los tres experimentos.

10.1. Experimento 1. Efecto del nivel de complementación con Metionina y Colina

10.1.1. Variables Plasmáticas

Variable	Tratamiento	10 Preparto	Parto	10 Posparto	20 Posparto
Triglicéridos (mg/100ml)	T0	52,4521	29,167	24,8014	27,1828
	T1	47,557	28,241	26,6536	29,4319
	T2	43,852	29,035	25,8598	25,9921
	T3	39,089	38,163	28,2412	31,1518
AGNES (mm/l)	T0	0,1103	0,2485	0,15818	0,10663
	T1	0,0858	0,1808	0,17942	0,08844
	T2	0,1341	0,2604	0,17013	0,16649
	T3	0,1366	0,2250	0,20284	0,16926
BHB (mm/l)	T0	0,6660	0,5375	0,77735	0,74844
	T1	0,6224	0,7123	0,90346	1,28525
	T2	0,8023	0,9034	1,4205	1,52852
	T3	0,7011	0,7303	0,9529	1,27438

10.1.2. Variables Hepáticas y Balance Nutricional

Variable	Tratamiento	10 Preparto	10 Posparto	20 Posparto
Triglicéridos (mg/g hígado fresco)	T0	36.0276	37.6338	43.7313
	T1	49.8036	51.5684	40.5343
	T2	36.8180	38.7806	37.8014
	T3	31.2850	40.1732	34.3019
Carnitina Libre (nmol/g hígado fresco)	T0	81.1542	64.5453	91.3729
	T1	38.9488	68.4565	95.6334
	T2	77.3540	91.6112	57.4226
	T3	63.8326	72.5500	70.0307
Carnitina Total (nmol/g hígado fresco)	T0	122.73	132.94	117.39
	T1	98.6789	108.41	122.18
	T2	94.1661	139.43	132.82
	T3	104.06	145.20	115.52
Acil-Carnitina (nmol/g hígado fresco)	T0	46.2541	53.1332	34.9581
	T1	121.22	51.8033	44.7413
	T2	20.6391	35.5817	75.5211
	T3	35.8907	50.2441	47.0340
Colina (mg/g hígado fresco)	T0	1.4014	1.6837	1.4906
	T1	1.2498	1.3793	1.2941
	T2	1.7968	1.6261	1.5690
	T3	1.5032	1.5551	1.4084
BaENL(Mcal/d)	T0	4.9221	-2.7308	-4.8554
	T1	-0.07452	-6.6756	-5.6075
	T2	2.3798	-6.1082	-3.6403
	T3	4.1021	-8.4290	-2.6570
BaPDR (g/d)	T0	98.3407	13.4084	-1.7560
	T1	75.8600	-0.1039	-1.2715
	T2	85.7313	0.3154	-13.7804
	T3	84.2872	-13.5196	-7.2897
BaPM (g/d)	T0	363.09	-63.5947	-63.9745
	T1	128.09	-305.06	-219.75
	T2	235.06	-142.60	-35.9756
	T3	279.32	-343.86	-7.1112

10.2. Experimento 2. Efecto del nivel de complementación con Fumarato de L-Carnitina

10.2.1. Variables Plasmáticas

Variable	Tratamiento	10 Preparto	Parto	10 Posparto	20 Posparto
AGNES (mm/l)	T0	0,10347	0,24522	0,14852	0,10089
	T1	0,11036	0,31838	0,12786	0,11524
	T2	0,11897	0,23747	0,10295	0,09515
BHB (mm/l)	T0	0,67386	0,54018	0,76144	0,74455
	T1	0,72891	0,90977	1,01986	0,95695
	T2	0,67386	0,65814	0,88618	1,10027

10.2.2. Variables Hepáticas y Balance nutricional

Variable	Tratamiento	10 Preparto	10 Posparto	20 Posparto
Triglicéridos (mg/g hígado fresco)	T0	35.1679	35.1236	42.5117
	T1	47.55	37.28	39.6533
	T2	30.0558	27.0083	25.7895
Carnitina Libre (nmol/g hígado fresco)	T0	79.9674	72.4723	92.6572
	T1	148.69	52.2164	77.4547
	T2	79.9388	92.9092	72.5953
Carnitina Total (nmol/g hígado fresco)	T0	120.37	145.28	109.81
	T1	184.27	81.2341	69.078
	T2	80.5254	118.2	125.22
Acil-Carnitina (nmol/g hígado fresco)	T0	43.7108	56.5269	38.6108
	T1	37.3691	17.1203	16.5676
	T2	12.3673	34.5845	48.8576
BaENL (Mcal/d)	T0	4.5575	-3.0785	-5.4796
	T1	4.1995	-4.0035	-2.1417
	T2	5.1594	-5.4239	-3.9097
BaPDR (g/d)	T0	96.5445	11.1294	-4.8376
	T1	95.0959	-15.4468	-24.0246
	T2	88.8727	-2.6508	-1.0442
BaPM (g/d)	T0	349.07	-89.3942	-83.4274
	T1	309.50	-147.47	-47.1292
	T2	346.26	-337.67	-184.56

10.3. Experimento 3. Efecto del nivel de complementación con combinaciones de Metionina-Colina y Fumarato de L-Carnitina

10.3.1. Variables Plasmáticas

Variable	Tratamiento	10 Preparto	Parto	10 Posparto	20 Posparto
Triglicéridos (mg/100ml)	T0	48,377	29,48482	25,67458	26,46838
	T1	51,170	22,17602	22,17602	27,8522
	T2	33,835	18,49418	18,03396	20,18168
	T3	38,897	18,34076	19,72146	18,34078
	T4	38,284	20,79534	14,35212	20,3351
AGNES (mm/l)	T0	0,11547	0,21750	0,16722	0,1074
	T1	0,13046	0,24322	0,21918	0,1371
	T2	0,0872	0,20956	0,14192	0,1056
	T3	0,10752	0,26872	0,15856	0,126
	T4	0,0857	0,20402	0,12752	0,1286
BHB (mm/l)	T0	0,6219	0,533897	0,843662	0,77594
	T1	0,7753	0,896716	1,061992	1,07206
	T2	0,7753	0,896716	1,230487	1,29278
	T3	0,8157	1,0054706	1,045084	1,17054
	T4	0,7753	0,748348	1,087258	1,54092

10.3.2. Variables Hepáticas y Balance Nutricional.

Variable	Tratamiento	10 Preparto	10 Posparto	20 Posparto
Triglicéridos (mg/g hígado fresco)	T0	36.2078	36.2801	43.5074
	T1	53.6858	36.8078	40.3820
	T2	49.7270	43.8397	53.3695
	T3	42.7143	33.2043	30.1158
	T4	44.6533	33.9025	34.7570
Carnitina Total (nmol/g hígado fresco)	T0	117.45	129.00	112.38
	T1	122.35	126.98	89.6118
	T2	145.83	102.27	97.7470
	T3	149.38	84.0773	147.15
	T4	113.55	116.90	180.01
Acil-Carnitina (nmol/g hígado fresco)	T0	44.4641	54.9948	36.5501
	T1	29.0302	57.3755	11.6676
	T2	35.8156	0.6974	17.5490
	T3	29.0869	19.4000	39.1080
	T4	54.4610	33.5945	53.32
Carnitina Libre (nmol/g hígado fresco)	T0	76.0268	58.7650	86.4653
	T1	90.3186	67.2288	72.6299
	T2	100.40	95.4053	76.8033
	T3	112.03	66.8348	79.3082
	T4	68.7714	81.2329	91.5549
Colina (mg/g hígado fresco)	T0	1.4032	1.6664	1.4989
	T1	2.0764	1.9677	1.7190
	T2	1.8945	1.9738	1.5312
	T3	1.8682	2.0594	2.0139
	T4	2.2332	2.2305	2.1309
AGL (mg/g hígado fresco)	T0	0.3922	0.3678	0.4230
	T1	0.5037	0.3905	0.3227
	T2	0.3347	0.5073	0.2989
	T3	0.3045	0.2761	0.2076
	T4	0.3398	0.2998	0.2400
BaENL (Mcal/d)	T0	5.5694	-2.5751	-4.6484
	T1	7.8119	-4.7708	-5.5676
	T2	6.5581	-4.8541	-5.6061
	T3	5.8997	-10.8381	-3.8442
	T4	7.2175	-6.5272	-3.2225
BaPM (g/d)	T0	413.67	-64.4952	-43.4340
	T1	441.25	-299.98	-147.99
	T2	406.88	-49.2510	-299.69
	T3	390.97	-447.78	-95.1326
	T4	476.40	-240.58	-103.20
BaPDR (g/d)	T0	98.8811	12.7384	-2.2406
	T1	89.6371	-16.3395	-12.0965
	T2	89.8754	-9.1052	-11.5647
	T3	83.0008	-12.8731	-24.6908
	T4	99.5607	-1.6042	-13.0393

Bibliografía

Al-Trad, B., Wittek, T., Gäbel, G., Fürll, M., Reisberg, K. and Aschenbach J.R. 2010. Activity of hepatic but not skeletal muscle carnitine palmitoyltransferase enzyme is depressed by intravenous glucose infusions in lactating dairy cows. *J. Anim. Phys. Anim. Nut.* 94: 685–695.

AOAC. 2005. Association of Official Analytical Chemists International (AOAC). Official methods of analysis of AOAC International. 18th edition. Maryland, USA.

Asanuma, N., Iwamoto, M., and Hino, T. 1999. Effect of the addition of fumarate on methane production by ruminal microorganisms in vitro. *J. Dairy Sci.* 82:780–787.

Bauchart, D. 1993. Lipid absorption and transport in ruminants. *J. Dairy Sci.* 76: 3864-3881.

Bauchart, D., D. Gruffat, and D. Durand. 1996. Lipid absorption and hepatic metabolism in ruminants. *Proc. Nutr. Soc.* 55: 39-47.

Bauman, D.E., and W.B. Currie. 1980. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorresis. *J. Dairy Sci.* 63: 1514-1529.

Bell, A.W. 1995. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J. Anim. Sci.* 73: 2804-2819.

Bell, A.W., W.S. Burhans, y T.R. Overton. 2000. Protein nutrition in late pregnancy, maternal protein reserves and lactation performance in dairy cows. *Proc. Nutr. Soc.* 59: 119-126.

Bertics, S.J. y R.R. Grummer. 1999. Effects of fat and methionine hydroxy analog on prevention or alleviation of fatty liver induced by feed restriction. *J. Dairy Sci.* 82: 2731-2736.

Bobe, G., Ametaj, B., Young, J., Beitz, D. 2003. Potential treatment of fatty liver with 14-daysubcutaneous injections of glucagon. *J Dairy Sci.* 86: 3138-3147.

Bremer, J., Christiansen, R.Z., and Boreebaek, B. 1978. Regulation of partition of free fatty acids between triglyceride synthesis and β -oxidation in liver. *Regulatory Mechanisms of Carbohydrate Metabolism. 1978: 161-170.*

Bremmer, D.R., S.J. Bertics, and R.R. Grummer. 1999. Differences in activity of hepatic microsomal triglyceride transfer protein among species. *Comp. Biochem. Physiol. A* 124: 123-131.

Bremmer, D.R., S.J. Bertics, S.A. Besong y R.R. Grummer. 2000. Changes in hepatic

microsomal triglyceride transfer protein and triglyceride in periparturient dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 83: 2252-2260.

Carlson, D.B., N.B. Litherland, H.M. Dann, J.C. Woodworth, and J.K. Drackley. 2006. Metabolic effects of L-carnitine infusion and feed restriction in lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 89:4819–4834.

Carlson, D.B., McFadden, J.W., D'Angelo, A., Woodworth, C., and Drackley, J.K. 2007a. Dietary L-carnitine affects periparturient nutrient metabolism and lactation in multiparous cows. *J Dairy Sci.* 90: 3422-3441.

Carlson, D.B., Woodworth JC , and. Drackley J. K. 2007b Effect of L-Carnitine Infusion and Feed Restriction on Carnitine Status in Lactating Holstein Cows. *J. Dairy Sci.* 90:2367–2376.

Carter, A.L. and Frenkel, R. 1978. The Relationship of Choline and Carnitine in the Choline Deficient Rat. *J. Nutr* 108:1748-1754.

Ceballos, A., Villa, N., Bohórquez, A., Quiceno, J., Jaramillo, M., Giraldo, G. 2002. Análisis de resultados de perfiles metabólicos en lecherías del trópico alto del eje cafetero colombiano. *Rev Col Cien Pec.* 15: 26-35.

Chalupa, W., and C. J. Sniffen. 1991. Protein and aminoacid nutrition of lactatin dairy cattle. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*; Vol. 7 (2):465-471.

Chapa, A.M., Fernandez, J.M., White, T.W., Bunting, L.D., Gentry, L.R., Ward, T.L., Blum, S.A. 1998. Infuence of intravenous Lcarnitine administration in sheep preceding an oral urea load drench. *J. Anim. Sci.* 76, 2930-2937.

Chapa, A.M., Fernandez, J.M., White, T.W., Bunting, L.D., Gentry, L.R., Lovejoy, J.C., Owen, K.Q. 2001. Influence of dietary carnitine in growing sheep fed diets containing non-protein nitrogen. *Small Ruminant Research* 40:13-28.

Chow, J.C, and B.W. Jesse. 1992. Interactions between gluconeogenesis and fatty acid oxidation in isolated sheep hepatocytes. *J. Dairy Sci.* 75: 2142-2148.

Christiansen, R.Z., and J. Bremer. 1976. Active transport of butyrobetaine and carnitine into isolated liver cells. *Biochim. Biophys. Acta* 448:562–577.

Clark, H., Klusmeyer, T.H. and Cameron, M.R. 1992. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows; *Journal of Dairy Science.* (75)2304.

Cooke, R.F., N. Silva Del Rio, D.Z. Caraviello, S.J. Bertics, M.H. Ramos, and R.R. Grummer. 2007. Supplemental choline for prevention and alleviation of fatty liver in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 90:2413–2418.

Correa, G.A. 2013. Profesor asociado área estadística. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. (Comunicación personal).

Correa, H. J. 2006. Posibles factores nutricionales, alimenticios y metabólicos que limitan el uso del nitrógeno en la síntesis de proteínas lácteas en hatos lecheros de Antioquia *Livestock Research for Rural Development*. 18 (43).

Correa, H.J., Pabón, M.L.; Carulla, J.E. 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. *Livestock Research for Rural Development*. 20 (4).

Correa, H.J., Pabón, M.L., Carulla, J.E. 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).

Dann, H.M., G.A. Varga, and D.E. Putnam. 1999. Improving energy supply to late gestation and early postpartum dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82: 1765-1778.

Davidson, S., B.A. Hopkins, J. Odle, C. Brownie, V. Fellner, and L.W. Whitlow. 2008. Supplementing limited methionine diets with rumen-protected methionine, betaine, and choline in early lactation Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 91:1552–1559.

Daily, J.W., and D.S. Sachan. 1995. Choline supplementation alters carnitine homeostasis in humans and guinea pigs. *J. Nutr.* 125:1938–1944.

De Koster, J., Hostens, M., Van Eetvelde, M., Hermans, K., Moerman, S., Bogaert, H., Depreester, E., Van den Broeck, W., and Opsomer, G. 2015. Insulin response of the glucose and fatty acid metabolism in dry dairy cows across a range of body condition scores. *J. Dairy Sci.* 98:4580–4592.

Douglas, G.N., J.K. Drackley, T.R. Overton y H.G. Bateman. 1998. Lipid metabolism and production by Holstein cows fed control or high fat diets at restricted or ad libitum intakes during the dry period. *J. Dairy Sci.* 81 (Suppl. 1): 295 (Abstr.)

Drackley, J.K., D.C. Beitz y J.W. Young. 1991a. Regulation of in vitro palmitate oxidation in liver from dairy cows during early lactation. *J. Dairy Sci.* 74: 1884-1892.

Drackley, J.K., D.C. Beitz y J.W. Young. 1991b. Regulation of in vitro metabolism of palmitate by carnitine and propionate in liver from dairy cows. *J. Dairy Sci.* 74:3014-3024.

Drackley, J.K., T.R. Overton y G. N. Douglas. 2001. Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. *J. Dairy Sci.* 84 (E. Suppl.): E100-E112.

Durand, D., Y. Chilliard y D. Bauchart. 1992. Effects of lysine and methionine on in vivo hepatic secretion of VLDL in the high yielding dairy cow. *J. Dairy Sci.* 75 (Suppl. 1): 279. (Abstr.).

Dyk, P.B., R.S. Emery, J.L. Liesman, H.F. Bucholtz y M.J. VandeHaar. 1995. Prepartum non-esterified fatty acids in plasma are higher in cows developing periparturient health problems. *J. Dairy Sci.* 78 (Suppl. 1): 264.

Edmonson, A.J., I.J. Lean, L.D. Weaver, T. Farver, and G. Webster. 1989. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72:68.

Emmanuel, B., and J.J. Kennelly. 1984. Kinetics of methionine and choline and their incorporation into plasma lipids and milk components in lactating goats. *J. Dairy Sci.* 67: 1912-1918.

Emery, R.S., J.S. Liesman y T.H. Herdt. 1992. Metabolism of long chain fatty acids by ruminant liver. *J. Nutr.* 122: 832-837.

Erfle, J.D., Sauer, F.D., and Fisher, L.J. 1974. Interrelationships Between Milk Carnitine and Blood and Milk Components and Tissue Carnitine in Normal and Ketotic Cow. *J Dairy Sci.* 57:671-676.

Erfle, J.D., Sauer, F.D., and Fisher, L, J. 1971. Effect of Infusion of Carnitine and Glucose on Blood Glucose, Ketones, and Free Fatty Acids of Ketotic Cows. *J Dairy Sci.* 54:673-680.

Espinal L.S. 1977. Zonas de vida o formaciones vegetales de Colombia: Mapas. Instituto Geografico Agustin Codazzi. 20 mapas.

Fedegan 2012.

[http://portal.fedegan.org.co/pls/portal/docs/PAGE/PORTAL/ESTADISTICAS1/COMERCIO%20EXTERIOR/GRAFICA%20_LECHE%20\(OCT%202011\).PDF](http://portal.fedegan.org.co/pls/portal/docs/PAGE/PORTAL/ESTADISTICAS1/COMERCIO%20EXTERIOR/GRAFICA%20_LECHE%20(OCT%202011).PDF). Consultado en agosto de 2013.

Galvis, G.R., Agudelo, D., Saffon, A. 2007. Condición corporal, perfil de lipoproteínas y actividad ovárica en vacas Holstein en lactancia temprana *Rev. Col. Cienc. Pec.* 20 (1):16-29.

Galvis, G.R., Correa, H.J., Ramírez, N., Soler, W. 2003. Influencia de las alteraciones metabólicas sobre la actividad PEPCK, IGF-1 plasmático y la reactivación ovárica en vacas en la lactancia temprana. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 16(3):228-236.

Galvis, R.D.; Valencia, D.; Correa, H.J.; Ramírez, N.F. Torres, J. 2010. Efecto de niveles crecientes de nitrógeno no protéico dietario sobre la concentración de precursores gluconeogénicos en hígado bovino. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín* 63(1): 5363-5372.

Gaviria, B.G., Gutiérrez, H.N., Molina, S.E., Ruiz, M.I., Tamayo, P.C., y col. Estudio de la infertilidad bovina en las zonas lecheras de Antioquia. U de A, Sec. Agric, ICA, Colanta. 1999; p. 100.

Geelen, M.J. and Wensing, T. 2006. Studies on hepatic lipidosiis and coinciding health and fertility problems of high-producing dairy cows using the "Utrecht fatty liver model of dairy cows". A review. *Vet Q.* 2006 Sep; 28(3):90-104.

Gibbons, G.F. 1990. Assembly and secretion of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochem. J.* 268: 1-13.

González, F.D, Muiño, R., Pereira, V., Campos, R., and Benedito, J.L. 2011. Relationship among blood indicators of lipomobilization and hepatic function during early lactation in high-yielding dairy cows. *J. Vet. Sci.* 12(3), 251-255.

González, F. y Koenekamp, I. 2006. Adaptaciones metabólicas hepáticas en el período periparto en vacas de alta producción de leche. Pontificia Universidad Católica de Chile Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Departamento de Ciencias Animales.

Goselink, R.M., Van Baal, J., Widjaja, H.C.A., Dekker, R.A., Zom, R.L., De Veth, M.J., and Van Vuuren, M.A. 2013. Effect of rumen-protected choline supplementation on liver and adipose gene expression during the transition period in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 96:1102–1116.

Graulet, B., D. Gruffat, D. Durand y D. Bauchart. 1998. Fatty acid metabolism and very low density lipoprotein secretion in liver slices from rats and preruminant calves. *J. Biochem.* 124:1212-1219.

Greenfield, R.B., M.J. Cecava y S.S. Donkin. 2000. Changes in mRNA expression for gluconeogenic enzymes in liver of dairy cattle during the transition to lactation. *J. Dairy Sci.* 83:1228-1236.

Gross, J., Schwarz, F., Eder, K., Van Dorland, A., and Bruckmaier, R.M. 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.

Gruffat, D., D. Durand, Y. Chilliard, P. Williams, and D. Bauchart. 1997. Hepatic gene expression of apolipoprotein B100 during early lactation in underfed, high producing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:657-666.

Gruffat-Mouty, D., B. Graulet, D., Durand, M. E. Samson-Bouma, and D. Bauchart. 1999. Apolipoprotein B production and very low density lipoprotein secretion by calf liver slices. *J. Biochem.* 126:188-193.

Grum, D.E., J. K. Drackley, R.S. Younger, D.W. LaCount y J.J. Veenhuizen. 1996. Nutrition during the dry period and hepatic lipid metabolism of periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 79:1850-1864.

Grummer, R. 1993. Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76:3882.

Hady P.J., Domecq J.J., Kaneene J.B. 1994. Frequency and Precision of Body Condition Scoring in Dairy Cattle. *J Dairy Sci* 77:1543-1547.

Hammon, H.M., Philipona, C., Zbinden, Y., Blum, J.W., and Donkin, S.S. 2005. Effects of Dexamethasone and Growth Hormone Treatment on Hepatic Gluconeogenic Enzymes in Calves. *J. Dairy Sci.* 88:2107–2116.

Hartwell, J.R., M.J. Cecava, and S.S. Donkin. 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.

Hegart, F.G. 1999. Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase: a control enzyme in ketogenesis. *Biochem. J.* 338:569-582.

Herdt, T.H., J.S. Liesman, B.J. Gerloff, and R.S. Emery. 1983. Reduction of serum triacylglycerolrich lipoprotein concentrations in cows with hepatic lipidosis. *Am. J. Vet. Res.* 44:293.

Herdt, T.H. 2000. Ruminant adaptation to negative energy balance. Influence on the etiology of ketosis and fatty liver. *Vet Clin North Am. Food Anim Pract.* 16:215-228.

Hippen, A.R., P. She, J.W., Young, D.C., Beitz, G.L. Lindberg, L.F. Richardson and R.W. Tucker. 1999. Alleviation of fatty liver in dairy cows with 14-day intravenous infusions of glucagon. *J. Dairy Sci.* 82:1139-1152.

Hocquette, J.F., and D. Bauchart. 1999. Intestinal absorption, blood transport and hepatic and muscle metabolism of fatty acids in preruminant and ruminant animals. *Reprod. Nutr. Dev.* 39:27-48.

Huntington, G.B. 1990. Energy metabolism in the digestive tract and liver of cattle: influence of physiological state and nutrition. *Reprod. Nutr. Dev.* 30:35-47.

Icontec. 1999. Norma técnica colombiana NTC 4657. Alimento para animales. Determinación del contenido de nitrógeno y cálculo del contenido de proteína cruda. Método Kjeldahl. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación.

Icontec. 2002. Norma técnica colombiana NTC 668. Alimentos y materias primas. Determinación de los contenidos de grasa y fibra cruda Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación.

Janovick Guretzky, N.A., D.B. Carlson, J.E. Garrett, and J.K. Drackley. 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.

Johnson H.E., N.L. Whitehouse, B.D. Garthwaite, M.S. Piepenbrink, and C.G. Schwab. 1999. Supplementation of corn and barley-based diets of late gestation and early lactation cows with liquid methionine hydroxy analog (HMB). *J. Dairy Sci.* 82(Suppl. 1):65. (Abstr.).

Jonker, J.S., Kohn, R.A., Erdman, R.A. 1998. Using milk urea nitrogen to predict nitrogen excretion and utilization efficiency in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 81:2681-269.

Kalaitzakis, E., N. Roubies, N. Panousis, K. Pourliotis, E. Kaldrymidou, and H. Karatzias. 2007. Clinicopathologic evaluation of hepatic lipidosis in periparturient dairy cattle. *J. Vet. Intern.Med.* 21:835–845.

Kleppe, B.B., R.J. Aiello, R.R. Grummer y L.E. Armentano. 1988. Triglyceride accumulation and very low density lipoprotein secretion by rat and goat hepatocytes in vitro. *J. Dairy Sci.* 71:1813-1822.

Knapp, J.R y R.L. Baldwin, Jr. 1990. Regulation of ketogenesis in dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 68(Suppl. 1):522. (Abstr.)

Lacount, D.W, Drackley JK, Weigel DJ. 1995. Responses of dairy cows during early lactation to ruminal or abomasal administration of L-carnitine. *J. Dairy Sci.*, 78:1824-1836.

Lacount, D.W, Emmert LS Drackley JK. 1996a. Dose Response of Dairy Cows to Abomasal Administration of Four Amounts of L-Carnitine. *J. Dairy Sci.*, 79:591-602.

Lacount, D.W, Ruppertt DL, Drackley JK. 1996b. Ruminal Degradation and Dose Response of Dairy Cows to Dietary L-Carnitine. *J. Dairy Sci.*, 79:260-269.

Leiva, T., Cooke, R.F., Brandão, A.P., Marques, R.S., and Vasconcelos, J. L. 2015. Effects of rumen-protected choline supplementation on metabolic and performance responses of transition dairy cows. *J.Anim Sci.* 93:1896-1904.

Lippke, H. 2002. Estimation of Forage Intake by Ruminants on Pasture; *Crop Science* 42: 869–872.

Löf, E., Gustafsson, H., and Emanuelson, U. 2007. Associations between herd characteristics and reproductive efficiency in dairy herds. *J. Dairy Sci.* 90:4897–4907

Lomax, M A., G.D. Baird, C.B. Mallinson y H.W. Simons. 1979. Differences between lactating and non-lactating dairy cows in concentration and secretion rate insulin. *Biochemical Journal*, 180:281-289.

Madrid, L.V. 2015. Efecto De La Inclusión de L- Carnitina Sobre el consumo de materia seca, concentraciones plasmáticas de AGNES y BHBA, la producción y composición de la leche en Vacas Holstein Durante el Periodo de Transición a la Lactancia. Trabajo de grado Maestría en Ciencias Agrarias. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín. 75p.

Malaguarnera, M. 2013. Acetyl-L-carnitine in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 28:193–199.

Marcos, E., A. Mazur, P. Cardot y Y. Rayssiguier. 1990. Serum apolipoproteins B and A-I and naturally occurring fatty liver in dairy cows. *Lipids* 25:575-577.

McCarthy, M.M., Mann, S., Nydam, D.V., Overton. T.R., McArt, J.A. 2015. *Short communication*: Concentrations of nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate in dairy cows are not well correlated during the transition period. *J. Dairy Sci.* 98:6284-5290.

Minor, D.J., S.L. Trower, B.D. Strang, R.D., Shaver Y., R.R. Grummer. 1998. Effects of nonfiber carbohydrate and niacin on periparturient metabolic status and lactation of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81:189-200.

Montoya, J.A. 2015. Efecto de la adición de colina y metionina sobre el consumo de materia seca, la producción y composición de la leche en vacas Holstein durante el periodo de transición a la lactancia. Trabajo de grado Maestría en Ciencias Agrarias. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín. 87p.

Mulligan, F. and M. Doherty. 2008. Production diseases: A major health, welfare and economic problem on dairy farms. *Vet. J.* 176:1-2.

NRC. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Seventh Revised Edition*. Subcommittee on Dairy Cattle Nutrition, Committee on Animal Nutrition, National Research Council. National Academy Press, Washington DC. 381p.

O'Connor, J.E., Costell, M., Míguez, M.O., Portolés, M., Grisolia, S. 1987a. Effect of L-carnitine on ketone bodies, redox state and free amino acids in the liver of hyperammonemic mice. *Biochem. Pharm.* 36(19): 3169-3173.

O'Connor, J.E., Costell, M., Grisolia, S. 1987b. The potentiation of ammonia toxicity by sodium benzoate is prevented by L-carnitine. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 145(2):817-824.

Osorio, J.S., Trevisi, E., Ji, P., Drackley, J.K., Luchini, D., Bertoni, G., and Loor, J.J. 2014. Biomarkers of inflammation, metabolism, and oxidative stress in blood, liver, and milk

- reveal a better immunometabolic status in peripartal cows supplemented with Smartamine M or MetaSmart. *J. Dairy Sci.* 97:7437–7450.
- Petit, H.V., Palin, M.F., and Doepel, L. 2007. Hepatic Lipid Metabolism in Transition Dairy Cows Fed Flaxseed. *J Dairy Sci.* 90:4780–4792.
- Piepenbrink, M.S. and T.R. Overton. 2003. Liver Metabolism and Production of Cows Fed Increasing Amounts of Rumen-Protected Choline During the Periparturient Period *J. Dairy Sci.* 86:1722-1733.
- Piepenbrink, M.S., A.L. Marr, M.R. Waldron, W.R. Butler, T.R. Overton, M. Vázquez-Añón and M.D. Holt, 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.
- Pinotti, L., A. Baldi, I. Politis, R. Rebucci, L. Sangalli, and V. Dell’Orto. 2003. Rumen-protected choline administration to transition cows: Effects on milk production and vitamin E status. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 51:18–21.
- Pinotti, L., A. Campagnoli, V. Dell’Orto, and A. Baldi. 2005. Choline: Is there a need in the lactating dairy cow? *Livest. Prod. Sci.* 98:149–152.
- Piot, C., J.H. Veerkamp, D. Bauchart, and J.F. Hocquette. 1998. Contribution of mitochondria and peroxisomes to palmitate oxidation in rat and bovine tissues. *Comp. Biochem. Physiol. B* 121:185-194.
- Prieto, J.A., Andrade, F., Aldámiz-Echevarría, L y 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.
- Pullen, D.L., D. L. Palmquist, and R.S. Emery. 1989. Effect on days of lactation and methionine hydroxy analog on incorporation of plasma fatty acids into plasma triglycerides. *J. Dairy Sci.* 72:49-58.
- Putnam, D.E., and Varga, G.A. 1998. Protein Density and Its Influence on Metabolite Concentration and Nitrogen Retention by Holstein Cows in Late Gestation. *J Dairy Sci* 81:1608–1618.
- Ramsay, R.R., Gandour, R.D., and Van der Leij, F.R. 2001. Molecular enzymology of carnitine transfer and transport. *Biochim. Biophys. Acta* 1546:21-43.
- Ratnakumar, L.I., Qureshi, I.A., Butterworth, R.F. 1993. Effect of L-carnitine on cerebral and hepatic energy metabolites in congenitally hyperammonemic sparse-fur mice and its role during benzoate therapy. *Metabolism.* 42(8):1039-1046.

- Rebouche, C.J. 1983. Effect of Dietary Carnitine Isomers and γ -Butyrobetaine on L-Carnitine Biosynthesis and Metabolism in the Rat. *J. Nutr.* 113: 1906-1913.
- Rebouche, C.J., and Mack, D.L. 1984. Sodium gradient-stimulated transport of L-carnitine into renal brush border membrane vesicles: kinetics, specificity, and regulation of dietary carnitine. *Arch Biochem Biophys* 235:393-402.
- Reid, I.M., C.J. Roberts, R.J. Treacher, and L.A. Williams. 1986. Effect of body condition at calving on tissue mobilization, development of fatty liver and blood chemistry of dairy cows. *Anim. Prod.* 43:7–15.
- Reynolds, C.K., G.B. Huntington, H.F. Tyrrell y P.J. Reynolds. 1988. Net metabolism of volatile fatty acids, B-hydroxybutyrate, nonesterified fatty acids, and blood gases by portal-drained viscera and liver of lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 71:2395-2405.
- Reynolds, C.K., P.C. Aikman, D.J. Humphries y D.E. Beever. 2000a. Splanchnic metabolism in transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83(Suppl. 1):257 (Abstr.).
- Reynolds, C.K., B. Durst, D.J. Humphries, B. Lupoli, A.K. Jones, R.H. Phipps, and D.E. Beever. 2000b. Visceral tissue mass in transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83(Suppl. 1):257 (Abstr.).
- Roche, J.R., Meier, S., Heiser, A., Mitchell, M.D., Walker, C.G., Crookenden, M.A., Vailati Riboni, M., Loor, J.J., and Kay, J.K. 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.
- Rulquin, H., Pisulewski, P.M., Verite, R. y Guinard, J. 1993. Milk production and composition as a function of postruminal lysine and methionine supply: a nutrient-response approach. *Livest. Prod. Sci.* 37, 69-90.
- Rulquin, H., R. Verite, and J. Guinard-Flament. 2001. Acides aminés digestibles dans l'intestin. Le système AADI et les recommandations d'apport pour la vache laitière. *INRA Prod. Anim.*, 2001, 14 (4), 265-274
- SAS User's Guide: Statistics, version 7. 1988. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Sato, H., Sugihara, M., Amatatsu, M., and 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.
- Schären, M., Jostmeier, S., Ruesink, S., Hüther, L., Frahm, J., Bulang, M., Meyer, U., Rehage, J., Isselstein, J., Breves, G., Dänicke, S. 2015. The effects of a ration change from a total mixed ration to pasture on health and production of dairy cows. *J. Dairy Sci.* Article in press. Published Online:November 25, 2015.

Schwab, C.G. 1996. Rumen-protected aminoacids for dairy cattle: Progress towards determining lysine and methionine requirements. *Anim. Feed Sci. Tech.* 59:87-101.

Soto, C., Valencia, A., Galvis, R.D., y Correa, H.J. 2005. Efecto de la edad de corte y del nivel de fertilización nitrogenada sobre el valor energético y proteico del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*). *Rev. Col. Cienc. Pec.* 18 (1):17 - 26.

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.

Sunvold, G.D., and Cochran, R.C. 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: 4951.

Takeuchi, T., Sugimoto, T., Nishida, N., Kobayashi, Y. 1988. Protective effect of D,L-carnitine on valproate-induced hyperammonemia and hypoketonemia in primary cultured rat hepatocytes. *Biochem. Pharm.* 37(11):2255-2258.

Tamai, I., Ohashi, R., Nezu, J., Yabuuchi, H., Oku, A., Shimane, M., Sai, Y., and Tsuji, A. 1998. Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2. *J. Biol. Chem.* 273:20378–20382.

Tedeschi, L. O., Pell, A.N., Fox, D.G., and Llamas, C.R. 2001. The amino acid profiles of the whole plant and of four plant residues from temperate and tropical forages; *Journal of Animal Science* 79: 525 – 532.

Tomomura, M., Tomomura, A., Dewan, M.D.; Abdullah, A.M., Saheki, T. 1996. Long-chain fatty acids suppress the induction of urea cycle enzyme genes by glucocorticoid action. *FEBS Letters* 399:310-312.

Ungerfeld, E.M., Kohn, R.A., Wallace, R.J. and Newbold, C.J. 2007. A meta-analysis of fumarate effects on methane production. in ruminal batch cultures. *J. Anim. Sci.* 85:2556–2563.

Vance, J.E, and Vance, D.E. 1990. Lipoprotein Assembly and Secretion by Hepatocytes. *Annual Review of Nutrition.* 10:337-356.

Van Den Top, A.M., T. Wensing, M.J.H. Geelen, G.H. Wentink, A.T. Van Klooster, and A.C. Beynen. 1995. Time trends of plasma lipids and enzymes synthesizing hepatic triacylglycerol during postpartum development of fatty liver in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 78:2208-2220.

VandeHaar, M.J., G. Yousif, B.K. Sharma, T.H. Herdt, R.S. Emery, M.S. Allen, and J.S.

- Liesman. 1999. Effect of energy and protein density of prepartum diets on fat and protein metabolism of dairy cattle in the periparturient period. *J. Dairy Sci.* 82:1282-1295.
- Vazquez-Añon, M., S. Bertics, M. Luck, R.R. Grummer, and J. Pinheiro. 1994. Peripartum liver triglyceride and plasma metabolites in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 77:1521-1528.
- Velle, W., Sjaastad, Ø.V., Aulie, A., Grønset, D., Feigenwinter, and K., Framstad, T. 1997. Rumen escape and apparent degradation of amino acids after individual intraruminal administration to cows. *J. Dairy Sci.* 80, 3325-3332.
- Vermeulen, P.S., S. Lingrell, Z. Yao, and D.E. Vance. 1997. Phosphatidylcholine biosynthesis is required for secretion of truncated apolipoprotein Bs from McArdle RH7777 cells only when a neutral lipid core is formed. *J. Lipid Res.* 38:447-458.
- Weber, C., Hametner, A., Tuchscherer, B., Losand, E., Kanitz, W., Otten, S.P., Singh, R.M., Bruckmaier, F., Becker, F., Kanitz, W., and Hammon, H.M. 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.
- Wester, T.J., Vazquez-Anon, M., Parker, D., Calder, A.G y Lobley, G.E. 2000a. Metabolism of 2-hydroxy-4-methylthio butanoic acid (HMB) in growing lambs. *J Anim. Sci.* 78(Suppl.1) /*J. Dairy Sci.* 83(suppl.1), Abstract 1126.
- Wester, T.J., Vazquez-Anon, M., Dibner, J., Calder, A.G y Lobley, G.E. 2000b. Synthesis of methionine from 2-hydroxy-4-methylthio butanoic acid (HMB) in growing lambs. *J Anim. Sci.* 78(Suppl.1)/*J. Dairy Sci.* 83(suppl.1), Abstract 1127.
- White, T.W., Fernandez, J.M., Gentry, G.T., Gentry, R.L., DeRouen, P.T., and Froetschel, M.A. 2001. Influence of Urea Alone or Combined with Fish Solubles, Fish Meal, or Feather Meal in Liquid Supplement with and Without L-Carnitine on Performance and Ruminant and Metabolic Parameters of Weanling Calves. *Prof. Anim Sci* 17:145-153.
- Wutzke, K.D., and Lorenz, H. 2004. The Effect of L-Carnitine on Fat Oxidation, Protein Turnover, and Body Composition in Slightly Overweight Subjects. *Metabolism.* 53 (8): 1002-1006.
- Yao, Z. y D. E. Vance. 1988. The active synthesis of phosphatidylcholine is required for very low density lipoprotein secretion from hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 263:2998-3004.
- Yu, C.Y., Chen, Y.S., Cheng, Y.H., Cheng, Y.S., Yang, C.M.J., and Chang, C.T. 2010. Effects of fumarate on ruminal ammonia accumulation and fiber digestion in vitro and nutrient utilization in dairy does. *J. Dairy Sci.* 93 :701–710.
- Zammit, V. A. 1990. Ketogenesis in the liver of ruminants. adaptations to a challenge. *J. Agric. Sci. (Camb.)* 115:155-162.

Zammit, V. A. 1996. Role of insulin in hepatic fatty acid partitioning: emerging concepts. *Biochem. J.* 314:1-14.

Zammit, V. A. 1999. Carnitine acyltransferases: functional significance of subcellular distribution and membrane topology. *Prog. Lipid Res.* 38:199- 224.

Zom, R.L., Van Baal, J., Goselink, R.M., Bakker, J.A., de Veth, M.J., Van Vuuren, A.M. 2011. Effect of rumen-protected choline on performance, blood metabolites, and hepatic triacylglycerols of periparturient dairy cattle. *J Dairy Sci.* 94:4016-4027.