

Efecto de la Suplementación con Biocholine Powder®, durante el periodo de transición sobre parámetros productivos, metabólicos y reproductivos de vacas lecheras a pastoreo

Effects of supplementation with Biocholine Powder® on productive, metabolic and reproductive parameters in grazing dairy cows during the transition period

Hernández, M.^a, Castillo, I.^b, Sepúlveda-Varas, P.^c, Gandarillas, M.^d, Keim, J.P.^{d*}

^a Escuela de Graduados, Facultad de Ciencias Agrarias y Alimentarias, Universidad Austral de Chile, Independencia 631, Valdivia, Chile.

^b Empresas Iansa, km 687 Ruta 5 Sur, Quepe, La Araucanía, Chile.

^c Instituto de Ciencias Clínicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Independencia 631, Valdivia, Chile.

^d Instituto de Producción Animal, Facultad de Ciencias Agrarias y Alimentarias, Universidad Austral de Chile, Independencia 631, Valdivia, Chile.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 03.06.2020

Accepted 01.12.2020

Keywords:

Milk production

Energy balance

Transition period

Original Research Article,

Animal Science

*Corresponding author:

Juan Pablo Keim

E-mail address:

juan.keim@uach.cl

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the effects of supplementation with rumen-protected choline (CPR) on milk production and composition, reproductive and metabolic parameters, and immune response of grazing dairy cows. Twenty Holstein-Friesian multiparous cows that calved in spring 2017 were fed a pre-partum diet and allocated into two treatment groups 21 days pre-calving: i) supplemented with CPR, (15 g day⁻¹) mixed with the feed until d 21 postpartum; ii) the non-supplemented group was considered as the control. There was no effect of supplementation with CPR on milk production throughout the complete lactation period. The supplemented group had a higher production at 21 d (P = 0.018) and showed a trend to higher production during the first 40 days of lactation (P = 0.051). Somatic cell count and somatic cell score (SCS) were higher for the non-supplemented group (P = 0.01). Regarding the reproductive indicators, the CPR-supplemented cows tended to start an oestrus phase 14.2 ± 7.1 days before the control group (P = 0.063). There was an interaction between treatment and weeks after parturition for BCS, where the CPR treatment showed recovery on week 3 postpartum, whereas for control cows it continued decreasing (P = 0.061). The results of the metabolic indicators suggest that cows in the control group, as well as those in CPR treatment, did not show a severe negative energy balance with a high risk of metabolic disorders and showed better fertility based on days to first oestrus.

RESUMEN

El estudio evaluó la suplementación con Colina Protegida en el Rumen (CPR) en vacas a pastoreo durante el periodo de transición, sobre la producción y composición de leche, parámetros reproductivos, metabólicos y respuesta inmune. Se utilizaron 20 vacas multíparas Holstein Friesian con partos de primavera. Veintinueve días previo a la fecha probable de parto, las vacas ingresaron a una dieta preparto, siendo divididas en dos tratamientos: i) suplementado con CPR, recibiendo 15 g día⁻¹ (1,6 g de fosfatidil colina) mezclados con el alimento hasta los 21 días post-parto; ii) grupo no suplementado (control). No hubo efecto de la suplementación con CPR sobre la producción de leche en la lactancia completa, pero sí una mayor producción a los 21 días (P = 0,018) y una tendencia durante los primeros 40 días de lactancia (P = 0,051). Los componentes lácteos no mostraron diferencias, excepto en el recuento de células somáticas y el score de células somáticas (SCS), siendo más alto en el grupo no suplementado (P = 0,01). Las vacas suplementadas con CPR manifestaron celo 14,2 ± 7,1 días antes que el grupo control (P = 0,063). La condición corporal (CC) controlada tuvo una tendencia a la interacción entre tratamiento y las semanas posteriores al parto, donde las vacas con CPR mostraron una recuperación en la CC en la tercera semana postparto (P = 0,061). Por medio de los indicadores metabólicos se observó que independiente del tratamiento las vacas no presentaron un balance energético negativo (BEN) severo ni alto riesgo de enfermedades metabólicas, mientras que la CPR mejoró la fertilidad al reducir los días al primer estro.

Palabras clave: Producción de leche, balance energético, período de transición

INTRODUCCION

En vacas lecheras, durante el último periodo de la gestación y a inicios de lactancia la capacidad de ingesta de materia seca está disminuida por la capacidad limitada del rumen producto del acelerado crecimiento fetal al final de la gestación y, por cambios de tipo fisiológico y hormonal que preparan a la vaca para el inminente parto (Ingvarsen y Andersen, 2000; Meikle *et al.*, 2010). Por otro lado, las necesidades de energía, aminoácidos y ácidos grasos de la glándula mamaria para la producción de leche van en aumento, entrando las vacas en un estado metabólico conocido como BEN. Durante el BEN las vacas requieren más energía de la que es posible proporcionar por medio de la dieta, recurriendo a mecanismos fisiológicos y metabólicos que les permiten adaptarse y enfrentar esta falta de energía movilizando las reservas corporales, tanto de tejido graso como tejido muscular utilizándolos como fuentes de energía (Meikle *et al.*, 2010). Una baja capacidad de adaptación al BEN puede resultar en la presentación de cuadros de enfermedad y desórdenes metabólicos tales como hipocalcemia, paresia puerperal, hipomagnesemia, cetosis, hígado graso, edema mamario, desplazamiento del abomaso, retención de placenta y metritis (Meikle *et al.*, 2010). Según Kitilit *et al.* (2015), la recuperación del BEN en vacas de alta producción comenzaría en vacas bien alimentadas alrededor de las 4 semanas, pero en la gran mayoría se logra alrededor de las 10 semanas de ocurrido el parto. La etapa más crítica desde el punto de vista de la salud y la producción de las vacas lecheras se concentra entre las tres semanas previas al parto y las tres primeras semanas de la lactancia, etapa que se conoce como periodo de transición (PT) (Grummer, 1995). Los cambios endocrinos y la disminución en el consumo de materia seca en la vaca en transición influyen sobre el metabolismo y conducen a una movilización de grasa desde el tejido adiposo y desde el glucógeno hepático. El BEN de inicio de lactancia se caracteriza por una disminución en plasma de Insulina, Leptina, Factor de crecimiento (IGF1) y glucosa y un aumento de la Hormona del crecimiento (HC), Ghrelina, Ácidos grasos no esterificados (AGNE) y Betahidroxibutirato (BHB) (Andresen, 2001). Para enfrentar el BEN se recurre al aumento de la gluconeogénesis hepática a partir de otros nutrientes orgánicos como el propionato y aminoácidos, se disminuye la utilización de glucosa por los tejidos periféricos y aumenta la movilización de ácidos grasos desde el tejido adiposo (lipólisis), generando glicerol y ácidos grasos para ayudar a cubrir las necesidades energéticas. Como resultado de estos procesos aumentan los ácidos grasos libres (AGL) y la producción de cuerpos cetónicos (acetona, acetoacetato y betahidroxibutirato) los que son utilizados como fuentes de energía cuando los niveles de glucosa son bajos (Grummer, 1993; Ingvarsen y Andersen, 2000).

Si el suministro de proteína y glucosa es insuficiente los ácidos grasos se acumularán en el hígado y los cuerpos cetónicos en la sangre (Andresen, 2001).

La severidad del BEN dependerá del potencial genético de producción, de las reservas corporales y principalmente de la capacidad de ingesta de materia seca (Ingvarsen y Andersen, 2000). En sistemas de producción de leche pastoriles la cantidad de materia seca ingerida se ve reducida en comparación a sistemas estabulados, lo que impide a las vacas alcanzar su potencial genético (Sheahan *et al.*, 2011) e incrementa el riesgo de un BEN severo (Roche *et al.*, 2011).

Existen estudios que han establecido que cuanto más severo es el BEN más problemas de salud se presentan (Kitilit *et al.*, 2015), así la productividad, salud metabólica y eficiencia reproductiva de las vacas lecheras puede ser dramáticamente afectada por el BEN.

Las vacas en el periparto sufren también una depresión del sistema inmune demostrado por una menor capacidad fagocítica de los Polimorfonucleares (PMN), menor respuesta de los linfocitos a producir anticuerpos y renovar su población y a menores concentraciones séricas de los componentes del sistema inmune de base humoral, como las inmunoglobulinas, el complemento y las conglutininas (Bargo *et al.*, 2009). Las deficiencias nutricionales durante el periodo de transición pueden afectar aún más el funcionamiento del sistema inmunológico (Bendich, 1993; Bargo *et al.*, 2009).

Se han buscado estrategias nutricionales para mitigar los impactos negativos del BEN mejorando el consumo de materia seca durante el periodo de transición y aumentando el aporte de energía en la dieta (Hutjens, 2013). También se ha fomentado el uso de aditivos que mejoren la eficiencia del metabolismo energético de las vacas lecheras alrededor del parto. Dentro de los productos más utilizados se encuentran el uso de precursores de glucosa, tales como el propilenglicol o sales de ácido propiónico (propionato de calcio). También se utilizan como aporte de energía después del parto las grasas *bypass*. Otro tipo de aditivos utilizados en la etapa de transición son los productos lipotrópicos tales como niacina, metionina, lisina y colina, que promueven la metabolización de las grasas en el hígado evitando su acumulación (Cardoso *et al.*, 2020).

Colina, llamada también trimetiletanolamina, se conoce como un integrante del grupo de vitaminas del complejo B, que se sintetiza endógenamente como fosfatidilcolina (PC). La colina es fundamental para el buen funcionamiento de todas las células ya que participa en la estructura y actividad de la membrana, forma parte de las lipoproteínas que transportan los lípidos a través del sistema circulatorio y contribuye al sistema nervioso colinérgico por su participación en la síntesis de acetilcolina (Shahsavari *et al.*, 2016; Jayaprakash *et al.*, 2016; Grummer, 2017). Como fuente de grupos metilo está involucrada en reacciones de transmetilación que

involucran el ácido fólico y la vitamina B12, tales como la síntesis de metionina y carnitina y la metilación del ADN. Esta función permite ahorrar grupos metilo en conjunto con otras sustancias que cumplen un rol similar como metionina y betaína (Jayaprakash *et al.*, 2016). La colina reduce la formación de hígado graso a inicios de la lactancia, lo cual constituye uno de los mecanismos de mayor interés en el uso en alimentación de vacas de leche. Según Jayaprakash *et al.* (2016) entre el 79% y el 99% de la colina ingerida en el alimento se degrada en el rumen, por lo que suplementar con altas cantidades por vía oral no se traduce en un aumento a nivel de la colina duodenal. En la actualidad, la colina se suministra como cloruro de colina recubierto de una matriz de ácidos grasos protegiéndola de la degradación de los microorganismos en el rumen, esta forma es llamada Colina Protegida en el Rumen (CPR). Las enzimas digestivas descomponen los ácidos grasos que recubren la CPR a nivel del intestino delgado, dejándolos libres para la absorción intestinal (Jayaprakash *et al.*, 2016).

Investigaciones han demostrado que la CPR reduce significativamente la conversión de AGNE a triglicéridos y aumenta el glicógeno en el hígado en vacas lecheras al momento del parto e inicios de lactancia (Goselink *et al.*, 2013; Shahsavari *et al.*, 2016). Estos cambios en el metabolismo pueden reducir el riesgo de cetosis clínica y formación de hígado graso, y todas las consecuencias de salud negativas que trae consigo esta condición, reportando incrementos de producción de leche (Hutjens, 2013). El uso de CPR durante el periodo de transición en vacas lecheras ha demostrado disminuir la concentración de AGNE en plasma y aumenta la exportación de grasa hepática disminuyendo el riesgo de trastornos metabólicos y a su vez aumentando la producción de leche (Sales *et al.*, 2010; Jayaprakash *et al.*, 2016; Shahsavari *et al.*, 2016; Grummer, 2017). No obstante, la información de la suplementación con CPR es limitada para sistemas pastoriles (Jayaprakash *et al.*, 2016; Cardoso *et al.*, 2020).

La hipótesis planteada en el estudio fue que la suplementación con CPR en la dieta de vacas lecheras durante el periodo de transición, disminuye parámetros asociados al BEN y la presentación de cuadros de enfermedades infecciosas y metabólicas, mejorando la respuesta productiva y reproductiva en vacas lecheras a pastoreo. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la respuesta productiva, metabólica y reproductiva de vacas lecheras a pastoreo suplementadas con CPR durante el período de transición.

MATERIALES Y METODOS

Ubicación del ensayo

El ensayo se realizó en la Estación Experimental Agropecuaria Austral (EEAA) de la Universidad Austral de Chile (UACH), ubicada en la comuna de Valdivia,

Provincia de Valdivia, Región de los Ríos (39°46'41''S, 73°13'44''W).

Animales y delineamiento experimental

Para este estudio se seleccionaron 20 vacas de raza Holstein Friesian, multíparas, con un promedio de producción en su lactancia anterior cercano a los 6.800 litros de leche. Las vacas fueron asignadas homogéneamente y separadas al azar en dos grupos de 10 vacas cada uno, de modo tal que cada grupo estuvo balanceado para el número de partos ($2,95 \pm 1,47$), producción de lactancia anterior (6824 ± 865) y días estimados al parto ($19,8 \pm 11,9$). Un grupo fue suplementado con CPR (Biocholine Powder®) y el otro grupo actuó como control sin recibir suplementación.

A los 21 días previo a la fecha probable de parto, se les suministró a las vacas una dieta preparto compuesta por 10 kg MS de ensilaje premarchito de pradera y 3 kg de concentrado preparto con sales aniónicas. Las vacas asignadas al grupo suplementado con CPR recibieron 15 g día⁻¹ del producto Biocholine Powder® (1,6 g de fosfatidil colina) mezclados con el alimento, el cual fue ofrecido de manera grupal. Una vez ocurrido el parto las vacas fueron manejadas junto al rebaño de la Estación Experimental recibiendo la misma alimentación y sometidas a los mismos manejos del rebaño. La dieta durante la lactancia fue principalmente en base a pradera, con incorporación de forraje conservado ajustada de acuerdo con los requerimientos nutricionales y disponibilidad de pradera en cada estación. El grupo suplementado con CPR continuó recibiendo 15 g del aditivo en forma individual junto al concentrado durante la ordeña por 21 días después del parto.

Toma de muestras y colección de datos.

Definición de las semanas relativas al parto.

Para efectos del estudio, tanto el periodo preparto como el periodo postparto fueron divididos en 3 semanas. Las semanas del preparto fueron definidas como semana relativa al parto -3 (SRP -3) entre 15 y 21 días \pm 2 días previos al parto, semana relativa -2 (SRP -2) entre 8 y 14 días previos al parto, y semana relativa al parto -1 (SRP -1) entre 2 y 7 días previos al parto. Las semanas del postparto fueron definidas como semana relativa al parto +1 (SRP 1) entre los días 2 y 7 posterior al parto, semana +2 (SRP 2) entre los días 8 y 14, y semana +3 (SRP 3) entre los días 15 y 21.

Muestras sanguíneas y diagnóstico de laboratorio.

A todas las vacas y de acuerdo con su fecha probable de parto se le colectó una muestra de sangre por

venopunción coccígea en forma semanal, durante las tres semanas previas al parto y tres semanas posteriores al parto. El muestreo se realizó a las 09:00 hrs para las vacas en preparto y después de la ordeña matutina (08:00 hrs) para las vacas en lactancia. La sangre colectada fue depositada en dos tubos, uno con y otro sin anticoagulante para el análisis de plasma y suero, respectivamente. Posterior a la colección de las muestras, los tubos fueron centrifugados a 800 xg durante 10 minutos a 4 °C, luego se colectó el plasma y suero sanguíneo para el posterior análisis. Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio Clínico de la UACH. A partir de estas muestras se realizó un hemograma (heritrograma más leucograma) por medio de un contador hematológico, (Humacount 30TS Marca Human). Utilizando una muestra de suero se determinó en forma posterior, utilizando un autoanalizador (Metrolab 2300, Wiener Lab, Rosario, Argentina), las concentraciones de colesterol, AGNE (método ACS-ACOD Enzimático, colorimétrico, 550 nm Marca Randox) y enzimas hepáticas GGT (Método cinético según IFFC; UV, colorim, 405 nm Marca Human), GD (Método cinético según DGKC; UV,UV, 340 nm Marca DiaSys) y AST (Método cinético según IFFC; UV, 340 nm Marca Human). A partir de las muestras de sangre tomadas semanalmente posterior al parto se midió BHB (Enzimático, 3-HBDH dependiente, UV,340 nm Marca Randox) y Ca (Método colorimétrico Arsenazo III, 650nm, Marca Wiener-lab).

Para las variables hematológicas se utilizaron como intervalo de referencia (IR) los valores entregados por el Manual de Patología Clínica Veterinaria (Wittwer, 2012), correspondiente al mismo laboratorio donde fueron procesadas las muestras.

Medición de condición corporal (CC).

Las vacas fueron evaluadas en forma semanal para CC durante el periodo de transición y en forma quincenal durante el resto de la lactancia, utilizando la escala de 5 puntos descrita por Edmonson *et al.* (1989).

Medición de la producción y composición de la leche.

Se llevó un registro individual diario de producción de leche de los animales a partir de los registros diarios y la base de datos generada por el software Alpro™ para Windows® que utiliza la EEAA para el manejo del rebaño. El volumen individual se obtuvo a partir de los medidores de leche MM27BC de la empresa DeLaval, tomando como valor para el análisis el promedio semanal de producción en litros de leche.

En forma quincenal se tomaron muestras de leche para realizar análisis composicional. Las muestras fueron procesadas por el Laboratorio de Calidad de Leche de INIA CARILLANCA. La materia grasa, la proteína y

la urea se midieron por espectroscopía infrarroja, según norma ISO 9622:2013 IDF 141 y manual del fabricante. Los sólidos totales y la lactosa se midieron por el método IR según manual del fabricante. Las células somáticas fueron medidas con el método Fluoro opto electrónico (Fossomatic 5000), según Norma IDF 148-2:2006-ISO 13366-2 y manual del fabricante S4000. Dado que el recuento de células somáticas (RCS) no sigue una distribución normal, los datos fueron transformados y analizados como el "score" de células somáticas (SCS) mediante la fórmula $SCS = \text{Log}_2^*(RCS/100) + 3$.

Evaluación de la actividad reproductiva.

La medición del retorno de la ciclicidad ovárica en las vacas se realizó de forma indirecta. Una vez iniciada la lactancia, a cada vaca se le instaló un dispositivo medidor de actividad y rumia (HDR-Heatime®, SCR Engineers, Netanya, Israel), el cual fue utilizado para detectar cambios en el comportamiento de los animales y detección de celo. Un simultáneo aumento en la actividad y una disminución de la rumia se consideró como manifestación de celo (Beauchemin, 2018). Entre los parámetros reproductivos a evaluar se incluyó el lapso parto 1^{er} celo, lapso parto preñez y número de servicios por preñez. Dentro del manejo reproductivo del rebaño lechero sometido al estudio se realiza inseminación a tiempo fijo, por lo que posterior a la presentación del primer celo todas las vacas fueron sometidas a este manejo.

Análisis estadístico.

Los datos fueron analizados estadísticamente con el programa SAS v9.4 a través de modelos mixtos (SAS Institute, 2006). En el caso de los parámetros sanguíneos se consideró la suplementación con CPR (Biocholine Powder®) como efecto fijo, el número ordinal de partos y la vaca como efectos aleatorios y, la semana relativa al parto (SRP -3, -2, -1, +1, +2, +3) como medida repetida en el tiempo más la interacción entre suplementación con CPR y las SRP. La estructura de covarianza utilizada fue AR1 y las vacas constituyeron el sujeto de medidas repetidas. En las variables reproductivas se incluyó sólo el efecto de la suplementación con CPR (Biocholine Powder®) y número ordinal de partos. Los parámetros productivos fueron analizados a nivel de lactancia completa y mensualmente, en este último caso el mes relativo al parto se incluyó como medida repetida en el modelo. En forma adicional se determinó la producción de leche a los 21, 40 y 90 días post parto. Se declaró un nivel de significancia de $P < 0,05$ y para la comparación de medias de las interacciones se utilizó Tukey ajustado al comando Pdiff (SAS Institute, 2006).

RESULTADOS

Variables hematológicas

Respuesta de vacas durante el parto

De acuerdo con el resultado de las pruebas hematológicas realizadas a las vacas durante las tres semanas previas al parto (SRP -3,-2 y -1), todas las variables en ambos grupos estudiados estaban dentro de los intervalos de referencia (IR), excepto por la concentración de hemoglobina (HB), que en ambos grupos el valor estuvo por debajo del IR (Cuadro 1). En el eritrograma se pudo observar que tanto el VGA (P = 0,03) como la HB (P = 0,02) mostraron diferencias significativas entre vacas tratadas con CPR y el grupo control, siendo los valores menores en el grupo tratado. No se observaron interacciones significativas entre el tratamiento y la semana relativa al parto.

Con relación al leucograma, todas las variables se observaron dentro de los intervalos de referencia. Las vacas tratadas con CPR mostraron un menor número de leucocitos (P = 0,03) que las vacas del grupo control.

Respuesta de vacas durante el post parto.

En las pruebas hematológicas realizadas a las vacas durante las semanas posteriores al parto (SRP +1, +2 y +3) sólo la hemoglobina se presentó fuera del IR (Cuadro 2).

En el eritrograma realizado durante las tres semanas posteriores al parto, no se observaron diferencias

significativas en ninguna de las variables medidas, excepto por las proteínas plasmáticas las cuales fueron inferiores en las vacas suplementadas con CPR (P = 0,001).

Se pudo observar diferencias en algunas variables relacionadas con la semana en la que se recolectaron las muestras después del parto. El VGA, fue en disminución (P = 0,018) mientras que las plaquetas (P = 0,021) fueron en aumento en la medida que avanzaron las semanas.

En cuanto a la fórmula leucocitaria no se observó diferencias entre el grupo tratado y el grupo control en las vacas posterior al parto, pero se observó diferencias altamente significativas entre semanas para el caso de los eosinófilos (P < 0,01), incrementando su concentración en la medida que avanzaban las semanas.

No se observó interacciones entre los tratamientos y las semanas de tratamiento para ningún parámetro evaluado. En cuanto al recuento de leucocitos, se pudo observar que a pesar de presentar todas las muestras valores dentro de los rangos de referencia, en el grupo tratado con CPR la concentración de linfocitos aumentó desde las muestras tomadas previas al parto a las muestras tomadas posterior al parto. En el caso del grupo control ocurrió lo contrario mostrando una disminución desde el periodo preparto al post parto.

Bioquímica sanguínea

En los Cuadros 3 y 4 se muestran los resultados relacionados a los parámetros medidos como indicadores del metabolismo energético y proteico, de la

Cuadro 1. Eritrograma, leucograma en vacas lecheras suplementadas con CPR y el grupo control, durante el periodo preparto.

Table 1. Pre-partum haematological parameters of cows supplemented with and without CPR.

Eritrograma	Intervalo Referencia	CPR		Control		Valor-P	Semana (SRP)			Valor-P	
		μ	EE	μ	EE		-3	-2	-1	Semana	Tra X sem
VGA (%)	28-38	30	0,5	31	0,5	0,030	30	30	31	0,340	0,514
HB (g L ⁻¹)	98-130	89	1,5	94	1,6	0,018	91	92	92	0,819	0,565
Erit (10 ⁶ μl ⁻¹)	5-8,5	5,89	0,1	5,89	0,1	0,985	5,92	5,91	5,86	0,963	0,610
VCM (fl ⁻¹)	43-61	50	1,1	53	1,1	0,085	51	52	53	0,675	0,188
CHCM (g L ⁻¹)	300-370	302	4,6	303	5,0	0,857	305	302	300	0,792	0,139
Plaquetas (10 ³ μl ⁻¹)	100-800	312	36,2	330	39,5	0,743	361	317	285	0,526	0,453
Leucograma											
Leucocitos (μl)	500-9500	6863	458	8386	495	0,030	6874	7854	8145	0,282	0,919
Linfocitos (μl)	2200-5800	2950	292	3467	315	0,236	2949	3334	3342	0,697	0,885
Eosinófilo (μl)	200-1000	400	51	463	55	0,411	446	508	340	0,200	0,516
Neutrofilo (μl)	1000-4000	3050	301	3695	328	0,155	2741	3467	3909	0,111	0,760
Monocitos (μl)	100-700	373	996	357	1065	0,991	330	400	364	0,999	0,998

Cuadro 2. Eritrograma, leucograma en vacas lecheras con y sin suplementación de CPR durante tres semanas posteriores al parto.

Table 2. Post-partum haematological parameters of cows supplemented with and without CPR.

Eritrograma	Intervalo Referencia	CPR		Control		Valor-P	Semana (SRP)			Valor-P	
		μ	EE	μ	EE		1	2	3	Semana	Tra X sem
VGA (%)	28-38	29	0,4	29	0,4	0,843	30	29	28	0,018	0,829
HB (g L ⁻¹)	98-130	91	1,1	91	1,3	0,727	93	92	88	0,076	0,802
Erit (10 ⁶ μl ⁻¹)	5-8,5	5,94	0,1	5,69	0,1	0,061	5,97	5,87	5,61	0,086	0,679
VCM (fl ⁻¹)	43-61	49	1,4	50	1,6	0,751	50	48	50	0,481	0,654
CHCM (g L ⁻¹)	300-370	315	2,9	312	3,3	0,480	311	314	317	0,531	0,524
Plaquetas (10 ³ μl ⁻¹)	100-800	404	21,0	360	21,9	0,153	328	380	439	0,021	0,246
Leucograma											
Leucocitos (μl)	500-9500	8114	424	7855	477	0,687	7446	8481	8027	0,421	0,171
Linfocitos (μl)	2200-5800	3318	214	3072	241	0,448	3104	3139	3343	0,809	0,831
Eosinófilo (μl)	200-1000	415	68	319	77	0,355	127	350	625	0,001	0,804
Neutrófilo (μl)	1000-4000	4055	296	4131	332	0,865	3841	4626	3812	0,241	0,161
Monocitos (μl)	100-700	306	41	310	46	0,944	370	317	238	0,227	0,079

Cuadro 3. Efecto de la suplementación con CPR sobre indicadores del metabolismo de energía, proteína, y mineral e indicadores de integridad del tejido hepático de vacas lecheras en el preparto.

Table 3. Effects of supplementation with CPR on blood metabolites related to energy, protein and mineral metabolism and liver function of dairy cows during the pre-calving period.

Variable ¹	Intervalo Referencia	CPR		Control		Valor-P	Semana (SRP)			Valor-P	
		μ	EE	μ	EE		-3	-2	-1	Semana	Tra X sem
Indicadores metabolismo energético											
Col (mmol L ⁻¹)	2,7-5,3	2,9	0,2	2,7	0,2	0,516	2,9	2,9	2,6	0,389	0,910
AGNE μmol L ⁻¹ *	100-600	203,3	43,7	255,9	46,1	0,413	161,0	203,0	324,8	0,101	0,365
Indicadores integridad del tejido hepático											
AST (U L ⁻¹)	50-150	72,8	3,7	64,7	3,8	0,136	67,7	65,1	73,5	0,418	0,632
GGT (U L ⁻¹)	0-39	29,8	1,4	27,0	1,5	0,187	27,9	28,2	29,0	0,907	0,727
GD (U L ⁻¹)	2-28	15,2	2,0	11,0	2,1	0,168	11,9	11,5	15,8	0,426	0,343
Indicador metabolismo de las proteínas											
Prot (g L ⁻¹)	65-84	76,9	0,9	76,2	1,0	0,607	78,6	77,5	73,7	0,015	0,909
Fibr (g L ⁻¹)	2-5	3,2	0,3	3,2	0,5	0,992	3,1	3,5	3,1	0,816	0,348
Indicador del metabolismo mineral											
Ca (mmol L ⁻¹)	2-2,6	2,4	0,1	2,3	0,1	0,159	2,4	2,4	2,3	0,438	0,042

*25% inferior en vacas preparto (Wittwer, 2012).

¹ Col: Colesterol; AGNE: Ácidos grasos no esterificados; AST: Aspartato amino transferasa; GGT: Gamaglutamil transpeptidasa; GD: Glutamato deshidrogenasa; Prot: Proteínas; Fibr: Fibrinógeno; Ca: Calcio.

integridad y funcionamiento del tejido hepático y del metabolismo del calcio en las vacas del estudio durante el periodo de transición. Todas las variables medidas se presentaron dentro del IR.

Respuesta de vacas durante el preparto

El perfil metabólico realizado semanalmente antes del parto no mostró diferencias entre los grupos ($P > 0,05$) en los indicadores de metabolismo energético (Cuadro 4). Solo se observó una disminución significativa de las proteínas plasmáticas en la medida que se acercaba el parto ($P = 0,015$).

En cuanto a los indicadores de la integridad del tejido hepático evaluados no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y tampoco entre las semanas previas al parto.

La concentración de calcio sanguíneo medido como principal metabolito mineral muestra en la Figura 1 una interacción entre los grupos tratados y la semana de tratamiento donde a partir de la SRP -2 la concentración de calcio disminuye fuertemente en el grupo control mientras que en el grupo tratado se observa un leve aumento ($P = 0,042$).

Respuesta de vacas durante el post parto.

Los resultados de los perfiles metabólicos realizados las 3 semanas posteriores al parto muestran que todas las enzimas y metabolitos medidos se encontraban dentro de los rangos de referencia. Excepto por los AGNE que en ambos grupos presentaron valores levemente por sobre el IR. El colesterol fue el único indicador del metabolismo energético que mostró diferencias altamente significativas entre las semanas de tratamiento, observando un aumento gradual de concentración en las tres semanas posteriores al parto ($P = 0,01$).

Todas las enzimas hepáticas medidas se encontraban dentro de los rangos de referencia. Existió una tendencia al aumento en la concentración de GGT y GD ($P < 0,1$) para el grupo tratado con CPR y se observó una diferencia significativa en los valores de AST siendo mayores en el grupo tratado ($P = 0,011$).

Variación de la condición corporal.

Como se observa en la Figura 2, hubo una tendencia en la interacción entre tratamiento y las SRP ($P = 0,061$), donde el grupo tratado con CPR muestra una

Cuadro 4. Efecto de la suplementación con CPR sobre indicadores del metabolismo de energía, proteína, y mineral e indicadores de integridad del tejido hepático de vacas lecheras en el postparto.

Table 4. Effects of supplementation with CPR on blood metabolites related to energy, protein and mineral metabolism and liver function of dairy cows during the post-calving period.

Variable ¹	Intervalo Referencia	CPR		Control		Valor-P	Semana (SRP)			Valor-P	
		μ	EE	μ	EE		1	2	3	Semana	Tra X sem
Indicadores Metabolismo Energético											
Col (mmol L ⁻¹)	2,7-5,3	2,9	0,1	2,8	0,2	0,731	2,3	2,9	3,5	0,001	0,789
BHB (mmol L ⁻¹)	0,06-0,6	0,64	0,0	0,67	0,1	0,713	0,7	0,6	0,6	0,357	0,701
AGNE (μmol L ⁻¹)	100-600	732	71,7	685	83,9	0,672	879,1	669,7	576,7	0,087	0,911
Indicadores Integridad del tejido hepático											
AST (U L ⁻¹)	50-150	103,4	4,8	83,5	5,7	0,011	85,8	98,1	96,4	0,356	0,561
GGT (U L ⁻¹)	0-39	31,8	1,3	28,6	1,4	0,099	27,7	31,3	31,6	0,182	0,948
GD (U L ⁻¹)	2-28	25,2	3,8	14,8	4,5	0,083	15,2	23,0	21,9	0,508	0,430
Indicador metabolismo de las proteínas											
Prot (g L ⁻¹)	66-90	74,1	0,9	79,4	1,1	0,001	73,9	77,6	78,7	0,025	0,641
Fibr (g L ⁻¹)	1-5	3,7	0,3	4,2	0,4	0,289	4,0	4,2	3,7	0,761	0,120
Indicador del metabolismo mineral											
Ca (mmol L ⁻¹)	2-2,6	2,3	0,1	2,3	0,1	0,960	2,4	2,3	2,4	0,650	0,419

¹ Col: Colesterol; AGNE: Ácidos grasos no esterificados; AST: Aspartato amino transferasa; GGT: Gamaglutamil transpeptidasa; GD: Glutamato deshidrogenasa; Prot: Proteínas; Fibr: Fibrinógeno; Ca: Calcio.

recuperación en la condición corporal en la tercera semana, mientras que el grupo control continúa con un descenso.

Producción y composición de la leche.

Resultados sobre la producción y composición láctea se presentan en el Cuadro 5. Al hacer el análisis de la producción y composición de leche para la lactancia completa, no hubo efecto de la suplementación con CPR sobre la producción de leche. Tampoco se observaron diferencias en producción (Kg) y concentración (%) de grasa, proteína y lactosa. Se realizó una evaluación de la producción de leche en diferentes etapas de la lactancia temprana (día 21, día 40 y día 90). La pro-

ducción diaria mostró una mayor producción de leche durante los primeros 21 días (P = 0,018) y una tendencia hacia una mayor producción durante los primeros 40 días (P = 0,051) en las vacas tratadas con CPR. La misma situación se observa para la producción acumulada en el día 21 y 40 respectivamente (P = 0,012 y P = 0,060). En forma posterior a los 40 días, la producción se iguala en ambos grupos. En los componentes lácteos sólo se observó diferencias en el RCS y el SCS, siendo más alto en el grupo no suplementado (P < 0,01).

Actividad reproductiva

En cuanto a los indicadores reproductivos que se midieron y se presentan en el Cuadro 6, se observó un

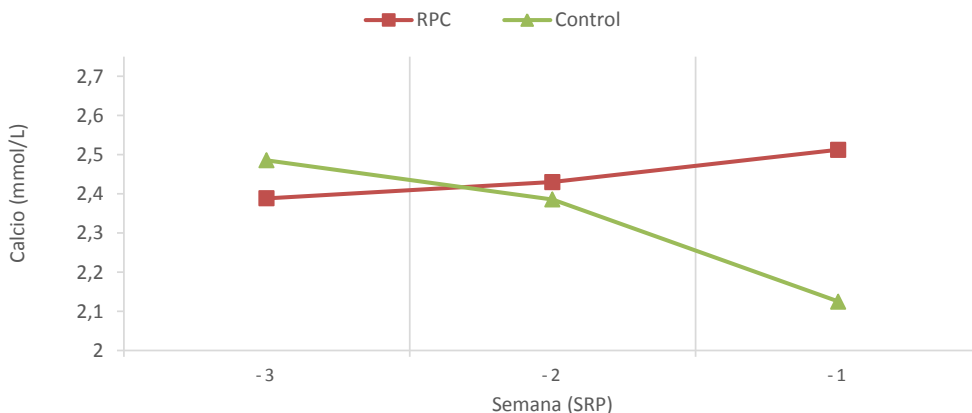


Figura 1. Concentración del calcio sanguíneo (μ) en vacas tratadas con CPR y grupo control, en las 3 semana previas al parto.
Figure 1. Effect of supplementation with CPR on blood Ca concentration (μ) of dairy cows during the three weeks pre-partum.

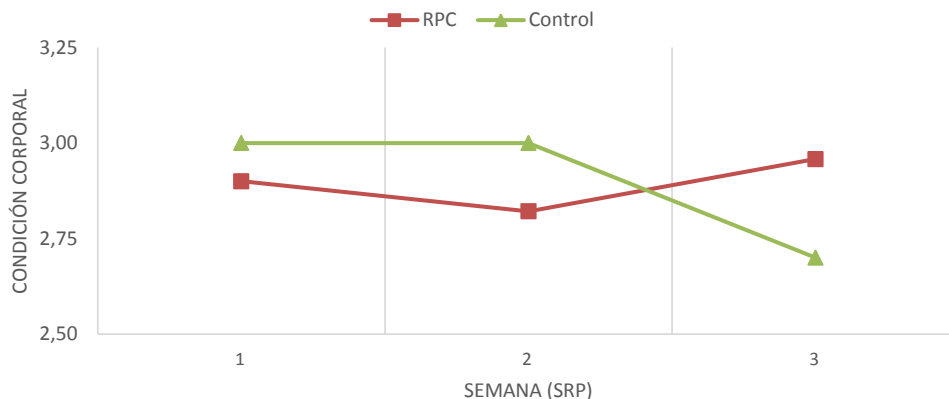


Figura 2. Interacción de la CC durante el periodo post parto entre el grupo tratado con CPR y el grupo control.
Figure 2. Interaction of body condition score of dairy cows during the post-partum period between the CPR and control groups.

efecto positivo a la suplementación con CPR para el indicador de días abiertos, mostrando las vacas del grupo suplementado su primera manifestación de celo 14,2 días antes que el grupo control ($P = 0,063$). El número de servicios por preñez y el Lapso Parto Preñez no mostraron diferencias.

DISCUSIÓN

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la respuesta productiva, metabólica y reproductiva de vacas lecheras a pastoreo suplementadas con CPR durante el período de transición.

Estudios sobre el uso de CPR en vacas lecheras durante la última década (Sales *et al.*, 2010; Jayaprakash *et al.*, 2016; Shahsavari *et al.*, 2016; Grummer, 2017), confirman que su utilización durante el periodo de transición en vacas lecheras disminuye la concentración de AGNE en plasma y aumenta la exportación de grasa hepática como lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), disminuyendo el riesgo de trastornos metabólicos y a su vez aumentando la producción de leche. Los cambios observados entre semanas durante la lactancia corresponden a la variación fisiológica de estos parámetros que se va dando en la medida que transcurre la lactancia.

Cuadro 5. Efecto de la suplementación con CPR sobre producción y composición de la leche a lo largo de la lactancia.

Table 5. Effect of supplementation with CPR on milk production and composition of dairy cows throughout the lactation.

Variable	Tratamientos				Valor-P
	CPR	EE	Control	EE	
Leche promedio 21 días (kg d ⁻¹)	31,4	1,5	29,7	2,4	0,018
Leche promedio 40 días (kg d ⁻¹)	32,6	2,2	31,7	2,6	0,051
Leche promedio 90 días (kg d ⁻¹)	32,1	2,1	32,5	2,8	0,052
Leche Acumulada 21 días (kg)	666,2	28,4	629,6	47,7	0,012
Leche Acumulada 40 días (kg)	1295,7	96,2	1254,8	109,0	0,060
Leche Acumulada 90 días (kg)	2714,3	224,9	2749,5	273,6	0,253
Grasa (%)	3,62	0,25	3,68	0,29	0,584
Proteína (%)	2,82	0,08	2,78	0,09	0,360
Lactosa (%)	4,94	0,10	4,94	0,11	0,975
Urea (g 100 ml ⁻¹)	0,02	0,00	0,02	0,00	0,165
RCS (cel*1000)	807,3	224,6	1209,2	266,17	0,000
Proteína (Kg)	0,99	0,05	0,96	0,05	0,182
Grasa (Kg)	1,22	0,07	1,21	0,08	0,780
S Totales (Kg)	2,21	0,11	2,17	0,12	0,455
SCS	3,5	0,5	4,3	0,62	0,001

Cuadro 6. Efecto de la suplementación con CPR sobre variables reproductivas.

Table 6. Effect of supplementation with CPR on reproductive parameters of dairy cows.

Variable	Tratamientos				Valor-P
	CPR	EE	Control	EE	
Días Abiertos (días)	49,2	4,7	63,4	5,3	0,063
N° de Servicios	1,60	0,22	1,37	0,25	0,520
Lapso Parto Preñez (días)	75,9	8,1	76,6	9,2	0,957

Salud, metabolismo energético e integridad hepática.

Los resultados de las pruebas hematológicas (Hemograma y Leucograma) medidas en las vacas durante el periodo parto no mostraron alteraciones, lo cual indicaría que todas se encontraban sin cuadros de enfermedades infecciosas durante el parto. Sólo la concentración de hemoglobina (HB), se presentó en ambos grupos levemente por debajo del IR, lo que se repitió en las muestras tomadas durante el post parto (SRP +1, +2, +3). Este valor bajo el IR está relacionado con la anemia relativa relacionada con la gestación. Según Herman *et al.* (2018), el IR para la hemoglobina medido en vacas entre 0 y 90 días post parto es menor que en otros periodos de la lactancia (entre 72 y 138 g L⁻¹), lo que se asocia a la pérdida de sangre durante el parto.

Shahsavari *et al.* (2016), mencionan que tejidos tales como eritrocitos, tejido adiposo, el corazón y los músculos esqueléticos requieren VLDL para transportar Vitamina E, el cual es un potente antioxidante. Según Grummer (1993), los rumiantes tienen intrínsecamente una baja capacidad para la síntesis de VLDL, y esto podría atribuirse en parte a la limitada disponibilidad de la colina dietaria para la síntesis de VLDL, por lo tanto, durante el transcurso del ensayo la colina podría haber mejorado la síntesis y exportación de VLDL después del parto.

Con relación al leucograma, las vacas tratadas con CPR mostraron un menor número de leucocitos que las vacas del grupo control, pero dentro del IR. El aumento significativo en los AGNE del plasma fomenta estrés oxidativo y a las respuestas inflamatorias no controladas (Kitilit *et al.*, 2015). Una respuesta inflamatoria disfuncional es el vínculo común entre las enfermedades metabólicas e infecciosas en el momento del parto (Sordillo *et al.*, 2013). Las diferentes pruebas hematológicas realizadas a las vacas durante las tres semanas posterior al parto siguieron mostrando valores dentro del IR. En el leucograma, el recuento de linfocitos del grupo control muestra una aparente disminución de los valores desde el periodo parto al post parto, mientras que en el grupo tratado con CPR la concentración de linfocitos aumentó desde las muestras tomadas previas al parto a las muestras tomadas posterior al parto. A pesar de estar todos los valores dentro del rango de normalidad esta diferencia podría mostrar una mayor actividad del sistema inmune en las vacas tratadas con CPR, asociadas al inicio de algún cuadro infeccioso post parto que no alcanzó a ser pesquisado (Zenobi *et al.*, 2020).

En los parámetros medidos como indicadores del metabolismo energético (colesterol y AGNE) no se observaron diferencias entre tratamientos antes del parto. Los valores séricos de AGNE encontrados en este estudio coinciden con los valores encontrados por Gómez

(2015) donde los valores de AGNE estuvieron entre 0,3 mmol L⁻¹ a 0,5 mmol L⁻¹ durante el parto, y entre 0,70 a 1,0 mmol L⁻¹ durante el post-parto.

Nuestros resultados concuerdan con Janovick *et al.* (2005), quienes determinaron que la suplementación con CPR no tuvo efecto sobre los niveles de AGNE ni de colesterol en vacas en parto, atribuido a que las vacas no se encontraban con una condición corporal excesiva al ingresar al parto, situación similar ocurrida en este estudio en que la CC promedio de ambos grupos al ingreso del periodo parto fue de 3,0 puntos.

Debido al daño celular, las concentraciones circulantes de las enzimas hepáticas como AST, la GGT, CK (Creatin kinasa) y LDH (Lactato deshidrogenasa) son elevados en vacas con síndrome de hígado graso. Según Noro *et al.* (2013) la actividad plasmática de AST elevada se observa en vacas con hepatitis infecciosa y tóxica, cirrosis, colestasis y lipidosis hepática; mientras que la liberación de AST desde el hepatocito ocurre durante estadios de recuperación de injurias hepáticas. Los indicadores de integridad del tejido hepático (AST, GGT y GD), junto con los niveles de BHB medidos en las vacas de este estudio se encontraban cercano al límite superior de referencia (0,64 y 0,67 mmol L⁻¹ para CPR y control respectivamente) y fueron disminuyendo posterior al parto (0,73 a 0,61 mmol L⁻¹ para las SRP +1 y +3), sugiriendo que tanto las vacas suplementadas con CPR como las del grupo control no presentarían cuadros de cetosis o hígado graso. Resultados similares obtuvieron Morrison *et al.* (2018) quienes observaron una disminución en las concentraciones de BHB de 0,67 a 0,61 y de 0,67 a 0,62 para vacas con y sin suplementación, respectivamente. Adicionalmente, no observaron diferencias en la proporción de vacas con niveles de BHB por sobre los 1,2 mmol L⁻¹. En este sentido, una adecuada condición corporal al parto permite mejorar el BE y, por ende, es más determinante en la presentación de cetosis que el uso de aditivos (Roche *et al.*, 2009; Allbrahim *et al.*, 2010).

En el estudio se midió la concentración de calcio sanguíneo mostrando una interacción entre los grupos tratados y la semana de tratamiento donde a partir de la SRP -2 la concentración de calcio disminuye fuertemente en el grupo control mientras que en el grupo tratado se observa un leve aumento. Es fisiológicamente natural que la concentración de calcio disminuya durante los últimos días antes del parto por la síntesis del calostro, normalizándose varios días después del parto (Andresen, 2001). Una de las posibles explicaciones al aumento de calcio sérico en vacas suplementadas con colina, podría explicarse ya que colina en su función de precursor de acetilcolina que participa a su vez, en la formación actividad de las fibras nerviosas colinérgicas. En ratas sometidas a una cirugía de disección de los nervios tiroideos o nervios inferiores laringales, disminuyó el consumo de colina de las neuronas paratiroides

y tiroideas. A los 10 días de la cirugía, se observó un incremento en los niveles de parathormona y un notable descenso del calcio sérico (Stern *et al.*, 1994).

Las vacas al inicio del estudio estaban en una condición corporal moderada como ya se mencionó, lo cual indica un menor riesgo de movilización de reservas de grasa corporal (Roche *et al.*, 2009). Se observó una tendencia de interacción entre tratamiento y la semana posterior al parto, donde el grupo tratado con CPR a partir de la segunda semana muestra una recuperación en la condición corporal, mientras que el grupo control continúa con un descenso. Este estudio no midió el consumo de materia seca, por lo que en este estudio no se pudo asociar a la variación de la condición corporal (Roche *et al.*, 2009). Sí se puede afirmar que, de acuerdo con las variables metabólicas medidas, ninguno de los grupos evidenció una movilización de grasa corporal que pusiera en riesgo la salud de las vacas, pero sí la recuperación de la condición corporal en el grupo tratado con CPR a partir de la segunda semana puede estar asociada a una mejor utilización de los sustratos de reserva movilizados durante el periodo de transición. En el estudio realizado por Janovick *et al.* (2005) se evaluó la condición corporal en el mismo periodo, es decir desde la SRP -3 hasta la semana 3 posterior al parto, y no se observaron diferencias entre el grupo tratado y el grupo control.

Producción y composición de la leche.

El análisis de la producción y composición de leche para la lactancia completa no mostró efecto de la suplementación con CPR sobre la producción de leche total. Este resultado es coincidente con el estudio de Janovick *et al.* (2005) y Pawar *et al.* (2015) donde se suministró 15 gr de colina por el mismo periodo de tiempo sin obtener una respuesta significativa en producción de leche, ni en su composición (materia grasa, proteína y lactosa). No obstante, al analizar la producción de leche en el primer tercio de la lactancia se observó una mayor producción de leche en las vacas tratadas con CPR de +0,7 y +0,9 L día⁻¹ durante los primeros 21 días y 40 días, respectivamente. Pinotti *et al.* (2003) informaron que la suplementación con 20 g de cloruro de colina entre 14 días antes del parto y 30 días después del parto aumentó el rendimiento de leche sin afectar la concentración grasa y proteína. El efecto directo puede reflejar un mayor nivel de metionina disponible para la síntesis de leche y reducir la acumulación de triglicéridos en el hígado, lo que lleva a un aumento de la gluconeogénesis hepática (Goselink, 2013), lo que concuerda con la menor pérdida de CC observada en las vacas suplementadas con CPR desde la semana +2 a la semana +3.

En teoría, fue planteado que la suplementación con CPR podría incrementar la concentración de grasa y

proteína en la leche al favorecer el transporte y utilización de lípidos en la glándula mamaria y las mayores concentraciones de caseína asociadas a una mayor disponibilidad de metionina (Jayaprakash *et al.*, 2016). No obstante, esta ventaja teórica no se ha reflejado en otros estudios (Piepenbrink y Overton, 2003; Morrison *et al.*, 2018), lo que concuerda con nuestros resultados.

Sólo el RCS y SCS medidos durante la lactancia mostraron diferencias altamente significativas siendo más bajo en las vacas tratadas con CPR. Lo anteriormente descrito indica un mejor estado de salud mamaria en las vacas tratadas siendo concordante con el mayor número de leucocitos medidos después del parto.

Actividad reproductiva.

De los tres parámetros reproductivos evaluados (días abiertos, N° de servicios y lapso parto preñez) se observó un efecto positivo a la suplementación con CPR para los días abiertos, mostrando las vacas del grupo suplementado su primera manifestación de celo 14 días antes que el grupo control. La relación que existe entre la severidad del BEN y el retorno a la ciclicidad ovárica se ha realizado midiendo niveles de concentración de hormonas en sangre (GH, IGF-1, Leptina, glucosa, insulina etc.) (Chandra *et al.*, 2011) o vigilando el momento en que ocurre la primera ovulación (Morrison *et al.*, 2018), estos concuerdan con Meikle *et al.* (2010), en que la CC y la pérdida de CC dentro de los primeros 60 días post parto afectan el reinicio de la ciclicidad ovárica. Sumado a este antecedente, la recuperación de la condición CC de la segunda semana postparto en las vacas tratadas con CPR da indicios de una mejor recuperación del BEN en este grupo y, por ende, resulta en una menor cantidad de días abiertos. Se ha descrito que la magnitud de la pérdida de CC afecta el reinicio del ciclo estral y por ende el lapso parto -primer celo (Butler, 2005; Roche *et al.*, 2009). El inicio de las ondas foliculares después del parto ocurre independientemente del estado del BEN, pero el desarrollo de un folículo a un tamaño preovulatorio con la probabilidad de una ovulación disminuye cuando la CC es pobre (Beam y Butler, 1999). Shahsavari *et al.* (2016), encontraron mayor crecimiento del folículo ovárico y reanudación de la ovulación, al suministrar 60 gr de CPR por vaca al día desde el parto hasta el día 42 post parto.

CONCLUSIONES

La suplementación con CPR no tendría efecto sobre la salud en términos de cuadros infecciosos y salud metabólica de las vacas, en sistemas pastoriles con vacas de nivel productivo medio (6.800 l por lactancia). La suplementación de las vacas con CPR durante el periodo de transición tiene un efecto positivo sobre la producción de leche a inicios de la lactancia (40 días) y la

reproducción, reflejándose en un retorno a la ciclicidad 14 días antes en las vacas del grupo tratado. Estos resultados están asociados a una tendencia en la recuperación de la condición corporal a partir de la SRP +2 en el grupo de vacas tratadas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quisieran agradecer al Dr. Ignacio Beltrán y la MV M.Cs. Carolina Fonseca por su ayuda en la toma de muestras. Al personal de la Estación Experimental Agropecuaria Austral por el cuidado y alimentación de los animales. Finalmente, a la empresa Agroservice Ltda. Por el financiamiento de la investigación.

REFERENCIAS

- Allbrahim, R.M., Crowe, M.A., Duffy, P., O'Grady, L., Beltman, M.E., Mulligan, F.J., 2010. The effect of body condition at calving and supplementation with *Saccharomyces cerevisiae* on energy status and some reproductive parameters in early lactation dairy cows. *Animal Reproduction Science* 121 (1-2), 63–71.
- Andresen, H., 2001. Vacas secas y en transición. *Revista Investigación Veterinaria Perú* 12 (2), 36–48. <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivp/v12n2/a08v12n2.pdf>
- Bargo, F., Busso, F., Corbellini, C., Grigera, J., Lucas, V., Podetti, V., Tuñon, G., Vidaurreta, I., 2009. Informe final del convenio de asistencia técnica institucional INTA-Elanco AACREA "Organización y Análisis de un sistema de registros de enfermedades del parto en vacas lecheras: incidencia e impacto económico sobre las empresas.
- Beam, S., Butler, W., 1999. Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 54, 411–24.
- Beauchemin, K.A., 2018. Invited review: Current perspectives on eating and rumination activity in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 101, 4762–4784.
- Bendich, A., 1993. Physiological role of antioxidants in the immune system. *Journal of Dairy Science* 76, 2789–2794.
- Butler, W.R., 2005. Relationships of negative energy balance with fertility. *Advances in Dairy Technology* 17, 159–168.
- Cardoso, F.C., Kalscheur, K.F., Drackley, J.K., 2020. Symposium review: Nutrition strategies for improved health, production, and fertility during the transition period. *Journal of Dairy Science* 103, 5684–5693.
- Chandra, G., Aggarwal, A., Singh, A.K., Kumar, M., Kushwaha, R., Singh, A., Singh, Y.K., 2011. Negative energy balance and reproduction: a review. *Agricultural Research Communication Centre* 32 (4), 246–254.
- Edmonson, A.J., Lean, I.J., Weaver, L.D., Farver, T., Webster, G., 1989. A body condition scoring chart for holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science* 72, 68–78.
- Gómez, L., 2015. Efecto de dos suplementos energéticos sobre el control del balance energético negativo en vacas de producción de leche. Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de ciencia Animal Palmira. Universidad Nacional de Colombia. 83 p.
- Goselink, R., Van Baal, J., Widjaja, H., Dekker, R., Zom, R., de Veth, M., Van Vuuren, M., 2013. Effect of rumen-protected choline supplementation on liver and adipose gene expression during the transition period in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 96, 1102–1116.
- Grummer, R.R., 1993. Etiology of lipid - Related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science* 76, 3882–3896.
- Grummer, R.R., 1995. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *Journal of Animal Science* 73, 2820–2833.
- Grummer, R., 2017. Choline: A limiting nutrient for transition dairy cows. *Pacific Northwest Animal Conference Proceedings* 2017. <https://www.ruminantia.it/wp-content/uploads/2017/02/PACIFIC-NORTHWEST-ANIMAL-CONFERENCE-PROCEEDINGS-2017.pdf>
- Herman, N., Trumel, C., Geffré, A., Braun, J.P., Thibault, M., Schelcher, F., Bourges-Abella, N., 2018. Hematology reference intervals for adult cows in France using the Sysmex XT-2000iV analyzer. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 30, 678–687.
- Hutjens, F.M., 2013. Fisiología digestiva y uso de aditivos en ruminantes. XXIX Curso Especialización FEDNA: Avances en nutrición y alimentación animal. 6-7 de Noviembre del 2013. Madrid, España, pp 17–31. http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/invernada_promotores_crecimiento/61-13CAP_Iltrad.pdf
- Ingvartsen, K., Andersen, J., 2000. Integration of metabolism and intake regulation: A review focusing on periparturient animals. *Journal of Dairy Science* 83, 1573–1597.
- Janovick, N.A., Carlson, D.B., Garrett, J.E., Drackley, J.K., 2005. Lipid metabolite profiles and milk production for Holstein and Jersey Cows fed Rumen-protected Choline during the periparturient period. *Journal of Dairy Science* 89, 188–200.
- Jayaprakash, G., Sathiyabarathi, M., Arokia, M., Tamilmani, T., 2016. Rumen-protected choline: a significance effect on dairy cattle nutrition. *Veterinary World* 9, 837–841.
- Kitilit, J.K., Cheroiyot, A.C., Kios, D.K., 2015. Review: Effects of negative energy balance on health and milk yield of lactating dairy cattle. *Egerton Journal of Science and Technology* 15, 1–10.
- Meikle, A., Cavestany, D., Carriquiry, M., Adrien, M.L., Rupechter, G., Rovere, G., Peñagaricano, F., Mendoza, A., Pereira, I., Mattiauda, D., Chilibroste, P., 2010. Endocrinología metabólica en la vaca lechera durante el periodo de transición y su relación con el reinicio de la ciclicidad ovárica. https://www.researchgate.net/publication/277856253_Endocrinologia_metabolica_en_la_vaca_lechera_durante_el_periodo_de_transicion_y_su_relacion_con_el_reinicio_de_la_ciclicidad_ovarica
- Morrison, E.I., Reinhardt, H., Leclerc, H., DeVries, H., LeBlanc, S.J., 2018. Effect of rumen-protected B vitamins and choline supplementation on health, production, and reproduction in transition dairy cows. *Journal of Dairy Science* 101 (10), 9016–9027.
- Noro, M., Cid P., Wagemann, C., Arnés V., Wittwer, F., 2013. Valoración diagnóstica de enzimas hepáticas en perfiles bioquímicos sanguíneos de vacas lecheras. *Revista MVZ Córdoba* 18, 3474–3479.
- Pawar, S., Kewalramani, N., Thakur, S., Kaur, J., 2015. Effect of

- Dietary Rumen Protected Choline Supplementation on Milk Choline Content in Crossbred Cows. *Indian Journal of Animal Nutrition* 32, 30–35.
- Piepenbrink, M.S., Overton, T.R., 2003. Liver metabolism and production of cows fed increasing amounts of rumen protected choline during the periparturient period. *Journal of Dairy Science* 86, 1722–1733.
- Pinotti, L., Baldi, A., Politis, I., Rebucci, R., Sangalli, L., Dell'Orto, V., 2003. Rumen-Protected Choline Administration to Transition Cows: Effects on Milk Production and Vitamin E Status. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 50, 18–21.
- Roche, J.R., Friggens, N.C., Kay, J.K., Fisher, M.W., Stafford, K.J., Berry, D.P., 2009. Invited review: Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *Journal of Dairy Science* 92 (12), 5769–5801. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2431>
- Roche, J.R., Burke, C.R., Meier, S., Walker, C.G., 2011. Nutrition x reproduction interaction in pasture-based systems: is nutrition a factor in reproductive failure? *Animal Production Science* 51, 1045–1066.
- Sales, J., Homolka, P., Koukolová, V., 2010. Effect of dietary rumen-protected choline in milk production of dairy cows: a meta-analysis. *Journal of Dairy Science* 93, 3746–3754.
- SAS Institute, 2006. 'SAS OnlineDoc 9.1.3.' SAS Institute Inc.: Cary, NC.
- Shahsavari, A., Michael, J.D., Al Jassim, R., 2016. The role rumen protected choline in hepatic function and performance of transition dairy cows. *British Journal of Nutrition* 116 (1), 35–44.
- Sheahan, A.J., Kolver, E.S., Roche, J.R., 2011. Genetic strain and diet effects on grazing behavior, pasture intake, and milk production. *Journal of Dairy Science* 94, 3583–3591.
- Sordillo, L.M., Raphael, W., 2013. Significance of metabolic stress, lipid mobilization, and inflammation on transition cow disorders. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 29, 267–278.
- Stern, J.E., Sarmiento, M.I.K., Cardinali, D.P., 1994. Parasympathetic control of parathyroid hormone and calcitonin secretion in rats. *Journal of the Autonomic Nervous System* 48, 45–53.
- Wittwer, F.G., 2012. *Manual de Patología Clínica Veterinaria*. 2ª ed. 200 p.
- Zenobi, M.G., Gardinal, R., Zuniga, J.E., Mamedova, L.K., Driver, J.P., Barton, B.A., Santos, J.E.P., Staples, C.R., Nelson, C.D., 2020. Effect of prepartum energy intake and supplementation with ruminally protected choline on innate and adaptive immunity of multiparous Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 103, 2200–2216.

