

Universidad de Costa Rica  
Sistema de Estudios de Postgrado

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE DOS  
FUENTES DE B-CAROTENO (ENTERAL Y  
PARENTERAL) EN VACAS LECHERAS Y SU  
RESPUESTA SOBRE: LA REPRODUCCIÓN Y LA  
CONCENTRACIÓN DE PROGESTERONA EN  
SANGRE, LA SALUD DE LA UBRE Y LAS  
CONCENTRACIONES DE B-CAROTENO EN SANGRE  
Y CALOSTRO.**

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del  
Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y  
Recursos Naturales para optar por el título de Maestría  
Académica en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales con  
énfasis en Nutrición Animal

**EDUARDO AGUIAR ZALZANO**

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio,  
Costa Rica,  
2018

## **Dedicatoria**

Este trabajo se lo dedico de manera muy especial a mi padre y madre quienes con sacrificios, paciencia y dedicación me han brindado la educación que disfruto hoy en día. De igual forma a mis hermanos quienes junto a mis padres me brindaron todo el apoyo necesario al emprender este reto fuera de mi país de origen, Venezuela.

De igual forma quisiera brindarles este trabajo a los profesores de zootecnia de la UCR y especialmente al MSc. Augusto Rojas Bourillón y el Dr. Jorge Alberto Elizondo Salazar, quienes de manera especial me brindaron todo el apoyo durante mi presencia como estudiante en la UCR y espero este trabajo hecho sirva para los productores lecheros del país.

De manera especial quisiera dedicarle este trabajo en agradecimiento por su apoyo a las familias Hernández Rojas y Jiménez Berrocal, quienes me acogieron en sus hogares durante mis estudios, brindando la compañía y apoyo que requerí en cada momento.

## **Agradecimiento**

Primero quisiera agradecer a Dios, quien me brindo en todo momento paciencia y sabiduría para poder dar por concluido este trabajo, pues estoy seguro de que sin su apoyo jamás lo hubiera logrado. De igual forma aprovecho la ocasión para retribuir a mis padres: José Aguiar Mendoza y Bianca Zalzano de Aguiar quienes me brindaron todo su apoyo en este reto emprendido.

De igual forma agradezco especialmente a Costa Rica y a la UCR (especialmente a: MSc. Augusto Rojas Bourrillon, Dr. Jorge Alberto Elizondo Salazar, Andrea Esquivel y Ana Sequeral) quienes me acogieron y brindaron todo el apoyo posible durante mis estudios y la confección de este trabajo. Así como a la familia Murillo Quesada, quienes me recibieron como uno más en la Finca El Milagro, brindando todo el apoyo en el desarrollo de este estudio.

Agradezco al profesor MSc. Julio Murillo Barrantes, quien brindó todo su apoyo en la realización de ultrasonido de las vacas del estudio y apoyó en todo momento en desarrollo de este trabajo.

Extiendo un especial agradecimiento a la empresa DSM y al Ing. Adrián Filomena, quienes brindaron todo el apoyo económico y de logística para el desarrollo de este estudio.

Por último, quisiera reconocer la colaboración realizada por las empresas:

- Dos Pinos: Por el apoyo en los estudios de células somáticas y perfil nutricional de los alimentos.
- Laboratorio de fertilización in vitro de la UNA: quienes colaboraron en los estudios de niveles de progesterona en sangre. Dra Laura Castro y Marcela Suarez.
- Laboratorio de CITA de la UCR: quienes realizaron los estudios de B carotenos en alimentos y calostro. Ing. Graciela Artavia.

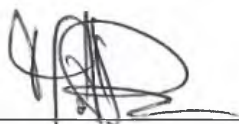
“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado y título de Maestría Académica en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales con énfasis en Nutrición Animal”



---

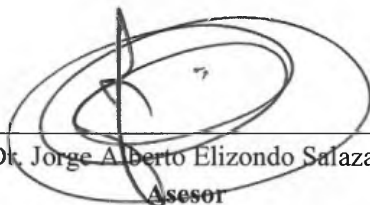
Dra. Catalina Salas Durán  
**Representante del Decano**

**Sistema de Estudios de Posgrado**



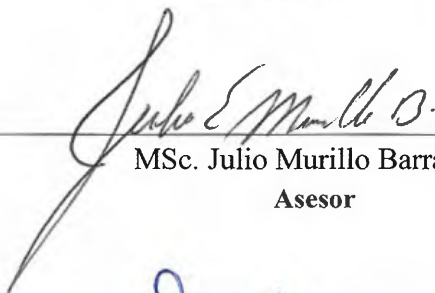
---

MSc. Augusto Rojas Bourrillon  
**Director de tesis**



---

Dr. Jorge Alberto Elizondo Salazar  
**Asesor**



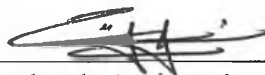
---

MSc. Julio Murillo Barrantes  
**Asesor**



---

Dr. Erick Guevara Berger  
**Director Programa de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales**



---

Eduardo Aguiar Zalzano  
**Candidato**

## Tabla de Contenido

Dedicatoria.....	ii
Agradecimiento.....	iii
Lista de cuadros.....	vii
Lista de Figuras.....	viii
Resumen.....	ix
Abstract.....	x
Lista de Abreviaturas.....	xi
Introducción.....	1
Revisión de literatura.....	1
Vitamina A y su importancia en la salud animal.....	1
Carotenoides y su aporte en la dieta de los bovinos. ....	1
Metabolismo del $\beta$ -caroteno y de la Vitamina A en los bovinos.....	2
Importancia de $\beta$ -caroteno en la reproducción.....	3
Importancia de $\beta$ -caroteno sobre el sistema inmunológico y su efecto sobre los bovinos.....	4
Justificación.....	6
Objetivo general. ....	7
Objetivos específicos.....	7
Materiales y métodos. ....	8
Análisis hormonal.....	11
Análisis de $\beta$ -caroteno en sangre.....	12
Análisis de $\beta$ -caroteno en calostro.....	13
Conteo de Células somáticas en leche.....	13
Evaluación ginecológica mediante ultrasonido.....	13

Análisis Estadístico.....	13
Resultados y Discusión.....	14
Niveles de $\beta$ -caroteno en sangre.....	14
Niveles de Progesterona en sangre.....	19
Efecto del $\beta$ -caroteno sobre los parámetros reproductivos.....	21
Intervalo parto-primer servicio.....	24
Efecto sobre el diámetro uterino y tamaño de cuerpo lúteo.....	25
Niveles de $\beta$ -caroteno en Calostro.....	27
Conteo de Células somáticas.....	30
Análisis Económico.....	33
Conclusiones y recomendaciones.....	35
Literatura Citada. ....	37

## Lista de cuadros

Cuadro	Página
1 Simulación de la concentración de $\beta$ -caroteno en las vacas en la finca “El Milagro”.....	9
2 Efecto de la suplementación de $\beta$ -caroteno enteral o parenteral, sobre las concentraciones de $\beta$ -caroteno en sangre ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ ).....	15
3 Efecto de la suplementación de $\beta$ -caroteno enteral o parenteral, sobre las concentraciones de $\beta$ -caroteno en sangre ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ ), separados por etapas post parto (cada 30 días).....	18
4 Efecto de la suplementación de $\beta$ -caroteno enteral y parenteral, sobre las concentraciones de progesterona en sangre ( $\eta\text{g}/\text{ml}$ ).....	19
5 Efecto de la suplementación de $\beta$ -caroteno enteral y parenteral, sobre la preñez a los 120 días post parto.....	23
6 Efecto de la suplementación de $\beta$ -caroteno enteral o parenteral, sobre las en intervalo parto-1er servicio (días).....	25
7 Efecto de la suplementación de $\beta$ -caroteno enteral o parenteral en el diámetro del cuerpo lúteo (mm).....	26
8 Efecto de la suplementación de $\beta$ -caroteno enteral o parenteral, sobre el diámetro uterino (mm).....	27
9 Efecto del tratamiento sobre el contenido de $\beta$ -caroteno ( $\mu\text{g}/100\text{ml}$ ) en calostro del 1er día.....	29
10 Efecto de la suplementación de $\beta$ -caroteno sobre las concentraciones de células somáticas en leche $\text{LOG}_{10}$ (cél/ml).....	31
11 Comparación del costo por tratamiento de $\beta$ -caroteno enteral y $\beta$ -caroteno parenteral expresado en \$US/vaca.....	34

## Lista de Figuras

<b>Figura</b>		<b>Pagina</b>
1	Protocolos de alimentación con diferentes fuentes de $\beta$ -caroteno.....	11
2	Efecto de la suplementación de $\beta$ -caroteno sobre las concentraciones de $\beta$ -caroteno en sangre ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ ) y sus variaciones durante el pre parto y postparto....	16
3	Efecto de la suplementación de $\beta$ -caroteno sobre las concentraciones de progesterona en sangre ( $\text{ng}/\text{ml}$ ) y sus variaciones durante el post parto.....	20
4	Efecto de la suplementación de $\beta$ -caroteno sobre la concentración de $\beta$ -caroteno en el calostro ( $\mu\text{g} / 100\text{ml}$ ).....	29
5	Efecto de la suplementación de $\beta$ -caroteno sobre las concentraciones de células somáticas ( $\text{cél}/\text{ml}$ ) en leche durante el post parto.....	32



## Resumen

Los  $\beta$ -carotenos, son precursores de la vitamina A y están presentes en algunos alimentos; por esta razón juegan un papel muy importante en la eficiencia reproductiva de las vacas y en funciones vitales de esta. Aunque los forrajes verdes presenten altas concentraciones de  $\beta$ -caroteno, estas pueden verse reducidas durante su almacenamiento, pasando de niveles de 300 ppm a 10 ppm al finalizar el invierno. Sin embargo, la suplementación de  $\beta$ -caroteno o vitamina A tiene un efecto directo sobre las concentraciones de estos en leche y sangre, generando resultados positivos sobre la reproducción.

En los bovinos las concentraciones de  $\beta$ -caroteno se ven afectadas por el ciclo productivo de la vaca, donde las concentraciones plasmáticas, decrecen durante el periodo seco, alcanzando su punto más bajo cerca del día 4 ó 6 postparto, pudiendo ocasionar problemas reproductivos, ya que estos están relacionados con el mecanismo complejo que provoca la primera ovulación post parto, afectando una onda folicular menor en el post parto; situación que se ve mejorada al administrar  $\beta$ -caroteno. De igual forma los niveles de progesterona están íntimamente relacionados con las concentraciones de  $\beta$ -caroteno en plasma. /

Otra función de importancia de la vitamina A y los  $\beta$ -carotenos es su relación directa con el sistema inmune, asociado a sus propiedades anti oxidativas, lo cual pueden influir de manera positiva sobre los problemas infecciosos en los animales, y por ende sobre los conteos de células somáticas en leche, afección causada por mastitis clínicas y sub clínica.

Por medio de este estudio se pretende evaluar los parámetros reproductivos, niveles de  $\beta$ -caroteno en calostro y células somáticas en leche, las concentraciones de  $\beta$ -caroteno y progesterona en plasma sanguíneo, parámetros reproductivos, retención de membranas fetales y cambios fisiológicos ocurridos en el sistema reproductivo de aquellas vacas suplementadas con  $\beta$ -caroteno, enteral o parenteral, durante el peri parto. Estudio realizado en la finca "El Milagro", una explotación lechera especializada, ubicada en la zona de San Juan de San Pedro de Poas, en la cual se tomaron 18 vacas secas, separadas en 3 grupos (control,  $\beta$ -caroteno parenteral y  $\beta$ -caroteno enteral) y se les realizó mediciones de  $\beta$ -carotenos, en plasma y calostro, concentraciones de progesterona en plasma (únicamente a 6 vacas), conteos de células somáticas en leche y mediciones de cuerpos lúteos, junto con el registro de todos los parámetros reproductivos.

Al final del estudio se pudo constatar que las concentraciones plasmáticas de  $\beta$ -caroteno se ven afectadas durante el ciclo productivo, siendo el nivel más bajo justo después del parto, aunque las vacas nunca tuvieron niveles inferiores al mínimo reportado por los autores. Sin embargo, la administración enteral del  $\beta$ -caroteno únicamente fue capaz de producir cambios significativos en: las concentraciones sanguíneas de progesterona y  $\beta$ -caroteno, y en los conteos de células somáticas en leche durante los primeros 120 días post parto. Sin afectar significativamente los parámetros reproductivos de las vacas evaluadas. Sin embargo, al realizar un análisis de costos de los tratamientos se pudo notar que únicamente con la mejora en los conteos de células somáticas en leche, el  $\beta$ -caroteno enteral es viable; no obstante, antes de instaurar un uso de este producto en una explotación se recomienda evaluar si en cada caso el producto es capaz de expresar sus bondades y resulta económicamente viable su utilización.

## Abstract

The  $\beta$ -carotenes, are precursors of vitamin A and they are present in some foods; for this reason, play a very important role in the reproductive efficiency of cows and in vital functions of the cow. Although green forages show high concentrations of  $\beta$ -carotene, but they can be reduced during storage, from levels of 300 ppm to 10 ppm at the end of winter. However, the supplementation of  $\beta$ -carotene or vitamin A has a direct effect on the concentrations of these in milk and blood, generating positive results on reproduction.

In cattle,  $\beta$ -carotene concentrations are affected by the productive cycle of the cow, where the plasma concentrations decrease during the dry period, reaching their lowest point near day 4 or 6 postpartum, which can cause reproductive problems after partum, since these may be related to the complex mechanism that causes the first postpartum ovulation. Affecting a minor follicular wave in the postpartum period; A situation that is improved when administering  $\beta$ -carotene. Similarly, progesterone levels are closely related to plasma  $\beta$ -carotene concentrations.

Another important function of vitamin A and  $\beta$ -carotene, is its direct relationship with the immune system, associated with its anti-oxidative properties, which can positively influence the infectious problems in animals, and therefore on the counts of somatic cells in milk, condition that is caused by clinical and subclinical mastitis.

The aim of this study was to evaluate the reproductive parameters, levels of  $\beta$ -carotene in colostrum and somatic cells in milk,  $\beta$ -carotene and progesterone concentrations in blood plasma, reproductive parameters, retention of fetal membranes and physiological changes in the reproductive system of those cows supplemented with  $\beta$ -carotene, enteral or parenteral, during peripartum. A study carried out in the farm "El Milagro", a specialized dairy farm, located in the San Juan in San Pedro, Poas, in which 18 dry cows were taken, separated into 3 groups (control, parenteral's  $\beta$ -Carotene and enteral's  $\beta$ -carotene) and measurements of  $\beta$ -carotene in plasma and colostrum, plasma progesterone concentrations (only 6 cows), somatic cell counts in milk and measurements of luteal bodies were performed, together with the recording of all reproductive parameters.

At the end of the study it was observed that plasma concentrations of  $\beta$ -carotene are affected during the production cycle, being the lowest level just after calving, although the cows never had levels below the minimum reported by the authors. However, enteral administration of  $\beta$ -carotene was only able to produce significant changes in: progesterone,  $\beta$ -carotene blood concentrations and somatic cell counts in milk, during the first 120 days postpartum. Without significantly affecting the reproductive parameters of the evaluated cows. However, when analyzing treatment costs, it was noted that only with the improvement in somatic cell counts in milk, enteral  $\beta$ -carotene is viable; however, before establishing a use of this product in a farm, it is recommended to evaluate whether in each case the product is able to express its benefits and is economically viable to use

## **Lista de Abreviaturas**

**cél/ml:** Células por mililitro.

**dl:** Decilitros.

**g/d:** Gramos por día.

**L:** Litro.

**MS:** Materia Seca.

**MSNM:** Metros sobre el nivel del mar.

**NRC:** National Research Council.

**PV:** Peso vivo.

**Trat:** Tratamiento.

**UI:** Unidades Internacionales.

**ng:** Nano gramo.

**μg:** Micro gramos.

## Introducción

Revisión de literatura

### **Vitamina A y su importancia en la salud animal.**

La vitamina A, también conocida como retinol, axeroftol, biosterol, vitamina antixeroftálmica y vitamina anti infecciosa, es un alcohol polienico isoprenoide (Quintela, *et al.*, 2008). Ésta es esencial en la dieta debido a las funciones vitales que desempeña en el organismo y a la incapacidad de organismo de producirla. Los  $\beta$ -carotenos, son precursores de la vitamina A y están presentes en algunos alimentos. Estos juegan un papel importante en la eficiencia reproductiva de las vacas y durante su metabolismo, son trasportados por el sistema linfático junto con la grasa y almacenados temporalmente en el hígado (Bendich y Olson, 1989) y (Kaewlamun *et al.*, 2011).

### **Carotenoides y su aporte en la dieta de los bovinos.**

La familia de los carotenoides está formada por más de 800 pigmentos naturales conocidos, producidos por las plantas superiores y algas; cumpliendo funciones en procesos fotosintéticos o como atrayentes de colores amarillo, naranja o rojo en flores y frutas; sin embargo, sólo unos pocos de ellos son precursores de la vitamina A, (Vogdanou, 2014 y Kalač 2013). El más común de estos, el  $\beta$ -caroteno, no puede ser sintetizado a partir de otros compuestos y tiene gran importancia como precursor de vitamina A, por lo que se hace necesaria su administración en aquellos sistemas de alimentación que presenten deficiencias (Searles y Armstrong, 1970). Aunque los forrajes verdes presenten altas concentraciones de  $\beta$ -caroteno, estos pueden verse reducidas durante su almacenamiento, como lo demostraron Arikan y Rodway (2001), quienes observaron una reducción en las concentraciones de 300 ppm a 10 ppm, al finalizar el invierno, en países templados; sin existir estudios similares publicados en climas tropicales.

De igual forma la estacionalidad y edad fenológica puede afectar la concentración de  $\beta$ -caroteno y  $\alpha$ -tocoferol en las gramíneas, como lo demostraron Ballet *et al.*, (2000), quien afirmó que la mayor concentración de estos se encontraban en la etapa vegetativa de espiga y brote para gramíneas y leguminosas, respectivamente, mientras que las concentraciones más bajas se obtuvieron después de la floración de las plantas

Los ácidos grasos volátiles, particularmente los ácidos fórmicos y propiónico, se han utilizado de manera constante como conservantes de ensilajes eficientes; sin embargo, su aplicación ha demostrado un aumento considerable en las pérdidas de  $\beta$ -caroteno, de manera especial si se combina con el acceso de oxígeno, tal como ocurre durante el retraso de sellado del silo o durante la utilización de este al final de un periodo. En este sentido se han observado pérdidas de  $\beta$ -caroteno en: forrajes verdes, forrajes deshidratados, ensilajes y heno de 19, 59 y 82% respectivamente, si se compara con los niveles iniciales (Kalač, 2013). De igual forma Vogdanou (2014), menciona que el proceso de ensilado puede reducir la concentración de carotenoides, siendo superior en el caso de las leguminosas, si se compara con las gramíneas, especialmente cuando el pH es alto (alrededor de 5), incrementándose esta pérdida si se incrementa el tiempo de almacenamiento en el silo.

#### **Metabolismo del $\beta$ -caroteno y de la Vitamina A en los bovinos.**

Keating, *et al.*, (1964), realizaron un estudio de estabilidad in vitro de  $\beta$ -caroteno, utilizando etoxiquina y nitrato de potasio para determinar la destrucción; demostrando recuperaciones medias de 83,4% a 3,5h y 72,7% a las 16 horas de incubación. Sin embargo, Weiss (1998) indicó, en el caso de los rumiantes, que no toda la vitamina A y el  $\beta$ -caroteno ingerido es absorbido, pues en solo 12 horas de incubación, in vitro, se destruyó entre el 60 y 72% del retinol. De igual forma, estudios realizados en Francia por Can *et al.*, (1986) y Puis (1994), (citados por Quintela *et al.*, 2008), demuestran, en rumiantes, que los niveles normales de vitamina A en sangre deben estar entre 25 y 89  $\mu\text{g}/\text{dl}$ , mientras que los  $\beta$ -carotenos se deben encontrar entre 300 y 1200  $\mu\text{g}/\text{dl}$ . De modo que cuantificar valores inferiores a 7  $\mu\text{g}/\text{dl}$  de vitamina A, o su equivalente a 100  $\mu\text{g}/\text{dl}$  de  $\beta$ -caroteno en sangre, podría considerarse una deficiencia severa, y en caso de valores intermedios se consideraría una deficiencia leve. Por ello, Quintela *et al.*, (2008), pudo notar que la suplementación de  $\beta$ -caroteno y/o vitamina A en animales con deficiencia de éstos (<300  $\mu\text{g}/\text{dl}$  y <25  $\mu\text{g}/\text{dl}$ , respectivamente) puede tener un efecto beneficioso sobre los parámetros reproductivos de éstos.

La suplementación de  $\beta$ -caroteno o vitamina A tiene un efecto directo sobre las concentraciones de estos en leche y sangre, como lo demostraron Michael *et al.*, (1994), quienes mencionan que al suplementar con 600mg de  $\beta$ -caroteno, se incrementaron los niveles de este en la leche

durante el inicio de la lactancia, mientras que al suplementar vitamina A (120.000 UI), durante el mismo periodo, observaron un incremento en las concentraciones de retinol en sangre, mientras se reducían las concentraciones de  $\beta$ -caroteno en esta. Esto se asocia a retroalimentación negativa propuesta por McDowell (2000), quien mencionó las rutas metabólicas para la conversión de  $\beta$ -caroteno a vitamina A son bloqueadas al tener valores elevados de vitamina A en sangre. En este sentido Schweigert, (2003), citado por Trojačanec *et al.*, (2012), establece que la reducción en los niveles de  $\beta$ -caroteno en suero puede resultar de la transformación de la  $\beta$ -caroteno disponible en vitamina A, proceso ocurrido particularmente en el útero y los ovarios.

Mora *et al.*, (1999), observaron porcentajes de degradación ruminal de  $\beta$ -caroteno en novillos entre 10,52% y 10,56% a las 8 y 16 horas, mientras que en cabras el valor fue de 9,16% a 9,90% respectivamente. Estos resultados *in vitro* muestran menores tasas de degradación del  $\beta$ -caroteno a los reportados previamente King *et al.*, (1962) y Keating *et al.*, (1964), donde se obtuvieron pérdidas de 27,3% a 34,4% entre 9 y 16 h de incubación. Por su parte, Van Soes, (1982), menciona que es probable que los carotenoides escapen al intestino delgado, sin ser degradado en el retículo-rumen; afirmación realizada también por Westendorf *et al.*, (1990), citado por, Mora *et al.*, (1999), quienes indicaron que los carotenoides, especialmente el  $\beta$ -caroteno, no se destruyen a nivel ruminal.

Los procesos metabólicos del  $\beta$ -caroteno tienen una fuerte relación entre la absorción de este y la raza, siendo las vacas más eficientes aquellas que contienen más grasa en la leche y mayor contenido de tejido adiposo blanco en el intestino (McDowell, 2000).

#### **Importancia de $\beta$ -caroteno en la reproducción.**

El ciclo productivo afecta las concentraciones de  $\beta$ -caroteno, decreciendo durante el periodo seco y alcanzan el punto más bajo cerca del día 4 ó 6 postparto (Johnston y Chew, 1984). Esta condición fisiológica podría ocasionar problemas reproductivos luego del parto, debido a que la concentración plasmática de  $\beta$ -caroteno durante este periodo, pudieran estar relacionado con el mecanismo complejo que provoca la primera ovulación post parto, ocasionando así un pobre índice ovulatorio en la primera onda folicular post parto (Kawashima *et al.*, 2009). Esto coincide con los resultados obtenidos por Rakes *et al.*, (1985), quienes notaron que al suplementar con

300 mg de  $\beta$ -carotenos durante los primeros 100 días de producción láctea, se adelanta la aparición del primer celo y se reduce el intervalo parto concepción ( $P < 0,05$ ). Similarmente Kawashima *et al.*, (2009) observaron que las vacas que ovulan durante la primera onda folicular post parto tienen niveles plasmáticos más altos de  $\beta$ -caroteno al compararla con vacas que no ovulan en la tercera semana post parto ( $2,97 \pm 0,24$  vs  $1,53 \pm 0,14$   $\mu\text{g/ml}$ ). Así, se puede indicar que las concentraciones plasmáticas de  $\beta$ -caroteno durante el periodo seco son mayores en vacas que ovulan durante los primeros 30 días post parto, si se compara con aquellas que no ovulan durante este mismo periodo.

Goto *et al.*, (1989) determinaron que los niveles plasmáticos de  $\beta$ -carotenos por encima de 200  $\mu\text{g/dl}$  están relacionados con la calidad y supervivencia embrionaria en vacas negras japonesas superovuladas. Mientras Shaw *et al.*, (1995), observaron que las vacas suplementadas con vitamina A, durante el inicio del proceso de súper ovulación, no produjeron mayor cantidad de óvulos, pero el número de óvulos transferibles totales fue mayor y de mejor calidad, al compararla con las vacas que no recibieron este suministro.

Las concentraciones hormonales son otro factor por considerar en la reproducción, donde las bajas concentraciones de progesterona se encuentran reportadas como uno de los factores causantes de la pérdida embrionaria temprana en vacas (Quintela *et al.*, 2008). Una relación positiva entre los niveles de  $\beta$ -caroteno en plasma y la progesterona producida por las células del cuerpo lúteo, ha sido demostrada por Grave-Hoagland *et al.*, (1988). Sin embargo, Kaewlamun *et al.*, (2011), no lograron demostrar un efecto directo sobre los niveles de progesterona, pero sí evidenciaron una reducción del indicador de la involución uterina (hidroxiprolina en sangre), junto a un efecto positivo en los porcentajes de leucocitos, polimorfo nuclear, tanto en el útero como en el cuello uterino, demostrando así el efecto de la suplementación de  $\beta$ -caroteno sobre los procesos inmunológicos del animal.

#### **Importancia de $\beta$ -caroteno sobre el sistema inmunológico y su efecto sobre los bovinos.**

Se ha demostrado que la vitamina A y los  $\beta$ -carotenos pueden influir de manera positiva sobre los problemas infecciosos en los animales, debido a su relación directa con el sistema inmune y sus propiedades anti oxidantes. Chawla y Kaur (2004), notaron que al administrar vitamina E sola o con  $\beta$ -caroteno se logra disminuir la incidencia de mastitis clínica y sub clínica en vacas.

De igual forma Akar y Gazioglu (2006) notaron que las vacas que presentaron retención de placenta tienen valores especialmente bajos de  $\beta$ -caroteno y de vitamina A.

En Costa Rica la retención de membranas fetales puede ser un factor a considerar, como lo cita Romero (1997), quien observó una alta variabilidad de incidencia de retención de membranas fetales en las exploraciones lecheras de este país, con valores que oscilan entre 0,2% y 21,4%, situación que actualmente resulta un problema frecuente en muchas lecherías del país, por lo que se pudiera considerar una posible disminución de estos valores al hacer una suplementación estratégica de  $\beta$ -carotenos en las explotaciones con alta incidencia de retención de membranas fetales y bajos niveles de  $\beta$ -caroteno en sangre durante el peri parto.

Según Arikan y Rodway (2001), las concentraciones de  $\beta$ -carotenos en el cuerpo lúteo dependerán de la temporada, de las reservas del animal y de su consumo en el alimento. En países templados las pérdidas rápidas de  $\beta$ -caroteno ocurren durante el almacenamiento de alimento en el invierno, por ello los cuerpos lúteos de los bovinos contiene una mayor concentración de  $\beta$ -caroteno durante los meses de mayor oferta de forraje fresco (primavera y verano), con respecto a los colectados durante los meses con mayor uso de forrajes conservados (invierno); sugiriendo así que los cambios de dieta ocurridos durante las estaciones afectan la acumulación de  $\beta$ -carotenos en tejidos tisulares. En contraparte, debido a las condiciones tropicales de Costa Rica, está pérdida pudiera ocurrir en el período de sequía, pues durante esta época se incrementa la utilización de forrajes conservados (heno y/o silo), los cuales no representan un aporte importante de  $\beta$ -caroteno en la dieta.

La suplementación de  $\beta$ -caroteno debe realizarse por un largo periodo de tiempo, para poder obtener un impacto positivo en la eficiencia reproductiva (De Ordanza *et al.*, 2009). Estos autores citaron a Arechiga *et al.*, (1998), quienes encontraron que al suplementar con 400 mg/día de  $\beta$ -caroteno, por un periodo menor a 90 días, no genera mejoras reproductivas en las vacas, pero al suplementar estas mismas vacas por un periodo superior a los 90 días se generó un incremento en la tasa de preñez a los 120 días post parto (35,4% vs 21,1%).



**Justificación.**

Al valorar las múltiples funciones que tiene la vitamina A en el organismo, y los graves efectos que puede tener su deficiencia en las funciones reproductivas e inmunológicas, se considera necesario realizar un estudio que evalúe los niveles, variaciones y manipulación de en las concentraciones de  $\beta$ -caroteno y/o vitamina A en clima tropicales durante el peri parto y su respuesta a nivel inmunológico, reproductivo y hormonal, esto con el propósito de solventar las deficiencias reproductivas e inmunológicas para la optimización de las explotaciones lecheras de la zona.

**Objetivo general.**

Evaluar los cambios fisiológicos e indicadores productivos y reproductivos en vacas suplementadas con  $\beta$ -caroteno, enteral o parenteral, durante el peri parto.

**Objetivos específicos.**

- Evaluar los efectos de la suplementación con  $\beta$ -caroteno, enteral o parenteral, sobre las concentraciones de progesterona y  $\beta$ -caroteno en sangre.
- Cuantificar las concentraciones de  $\beta$ -caroteno en el calostro y correlacionarla con las concentraciones de  $\beta$ -caroteno en sangre.
- Evaluar los efectos de la suplementación con  $\beta$ -caroteno, enteral o parenteral, sobre las concentraciones de células somáticas en leche.
- Valorar los cambios en la actividad ovárica y correlacionarlos con las concentraciones de  $\beta$ -caroteno en sangre.
- Evaluar los parámetros reproductivos (retención de membranas fetales, intervalo parto primer servicio y tasa de preñez) y correlacionarlos con las concentraciones de  $\beta$ -caroteno en sangre.

## **Materiales y métodos.**

El estudio inicio el 5 de agosto de 2014, y ha culminado su muestreo en Diciembre de 2015.

Se realizó en la finca “El Milagro”, una explotación lechera especializada, ubicada en la zona de San Juan de San Pedro de Poas, provincia de Alajuela, Costa Rica. La zona se encuentra a 1300 msnm y registra una precipitación y temperatura anual media de 3500 mm y 11,5 °C respectivamente; siendo considerado un bosque muy húmedo pre montano según la clasificación geoecológica (Monge, 2007)

Se usaron en total 18 vacas cruzadas, Hostein-Pardo Suizo y Holstein-Jersey, presentando una condición corporal entre 3,25 y 3,75 y un peso vivo entre 450 y 550 Kg. Una vez obtenida una lista de los animales próximos al parto, se asignaron los tratamientos al azar, alternando entre el control  $\beta$ -caroteno enteral y  $\beta$ -caroteno parenteral, para evitar que alguno de estos tenga mayor numero de animales en una determinada época del año.

La finca “El Milagro” cuenta con vacas de leche especializadas las cuales son ordeñadas 2 veces al día de forma mecánica. Cuenta con aproximadamente 1 hectárea de terreno y un promedio de 30 vacas en ordeño, lo cual cuenta demuestra una alta densidad de animales afectando el aporte de materia verde fresca en los animales, situación que puede comprometer el aporte de  $\beta$ -Caroteno a los animales. La alimentación de todas las vacas se realizó a base de: concentrado Vapp Feed<sup>®</sup> o Pre-Parto<sup>®</sup>, residuo de cervecería, Citrocom<sup>®</sup>, cascara de piña y *pasto* estrella africana (*Cynodon nlemfluensis*) de 45 días. Se realizó un balance en el NRC de los consumos de estas de acuerdo con su estatus productivo (seca o inicio de lactación), con el fin de conocer el balance nutricional de acuerdo con los requerimientos del programa de nutrición de NRC, (cuadro 1).

En el cuadro 1 se puede apreciar un mayor aporte de  $\beta$ -caroteno proveniente del pasto fresco, resultados que concuerdan con lo observado en el capítulo anterior, donde diversos autores afirman una reducción significativa de este compuesto luego de su almacenaje.

**Cuadro 1:** Simulación de la concentración de  $\beta$ -caroteno en las vacas en la finca “El Milagro”.

<i>Material</i>	<i>Aporte de β-Caroteno (mg/Kg MS)</i>	<i>Secas (Consumo Kg MS/vaca/día)</i>	<i>Lactación (Consumo Kg MS/vaca/día)</i>
<i>Cascara de piña</i>	1,2	2,1	4,3
<i>Pasto Estrella</i>	40,74	2,08	2,2
<i>Citrocom</i>	14,41	0,87	1,8
<i>Residuo de cervecería</i>	2,15	2,72	4,2
<i>Vapp feed</i>	32,89	-	2,3
<i>Pre-parto</i>	34,10	1,31	-
<i>Multiplex*</i>	3.156,95*	0,09*	-
<i>Boviplex*</i>	2.173,29*	-	0,1*
<i>Total (mg/día) control y β- caroteno parenteral**</i>		<b>209,84</b>	<b>301,01</b>
<i>Total (mg/día) β-caroteno enteral**</i>		<b>509,75</b>	<b>512,91</b>

\* Aportado únicamente a vacas tratadas con β-caroteno enteral

\*\* Total de β-caroteno aportado en base a materia seca consumida y aporte de este por Kg MS.

Los requerimientos de β-caroteno según Chew (1987), son 300 - 600 mg/día.

Datos tomados de medición realizada al iniciar el estudio, con muestras tomadas directamente de la finca El Milagro.

Es importante destacar que, aunque la simulación demuestra que las vacas satisfacen aparentemente los requerimientos de β-Caroteno, los mismos, mencionados por Crew *et al.*, (1987), corresponden a países con condiciones climáticas muy diferentes a las presentes en

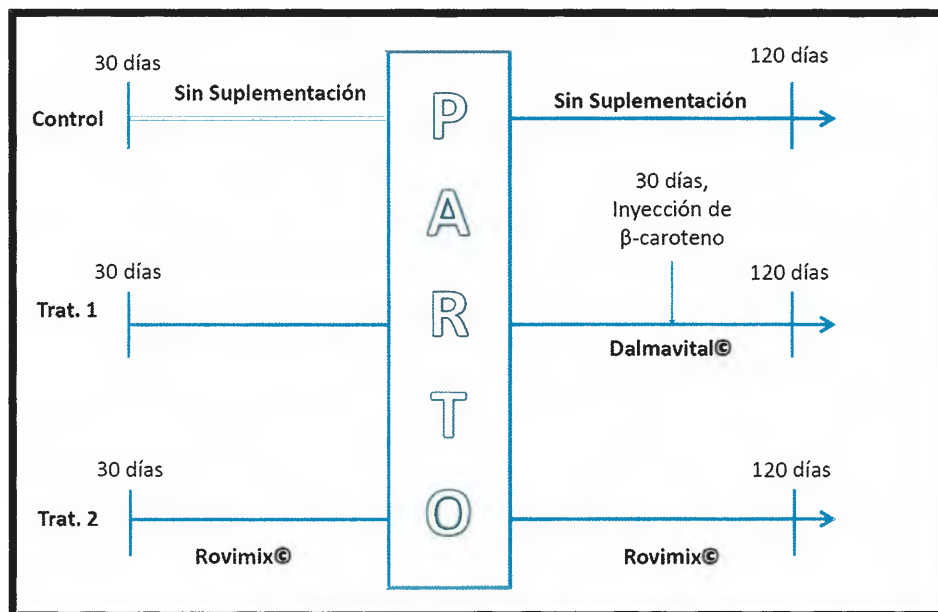
**Costa Rica** y como se evidencia en el capítulo anterior las condiciones de stress térmico afectan **los requerimientos** de  $\beta$ -caroteno del animal.

El contenido de  $\beta$ -caroteno se cuantificó mediante espectrofotometría, usando la metodología oficial descrita por la AOAC 941.15 (2005). Es importante destacar que todos los materiales evaluados han sido transportados laboratorio del CITA, en la UCR, el mismo día de su recolección, para evitar alteraciones en los resultados durante su transporte. Realizando tres mediciones, obteniendo un valor promedio acorde a las diferentes épocas del año, lo cual afecta la floración y contenido nutricional de las gramíneas.

El experimento fue dividido en tres tratamientos, con seis repeticiones cada uno y distribuidos completamente al azar. Las vacas asignadas al **control** se suplementaron únicamente con la dieta base (figura 1) sin recibir suplemento alguno de  $\beta$ -caroteno. Las pertenecientes al **tratamiento 1**, recibieron, aparte de la dieta base, una inyección intramuscular de 3,5 ml de Dalmavital<sup>®</sup> por cada 100kg de PV (equivalentes a 52,5 mg de  $\beta$ -caroteno por cada 100 kg de PV), las cual fue administrada 30 días post parto. Mientras que las asignadas al **tratamiento 2**, recibieron igualmente la dieta base, a la cual se le adicionó, a partir del día 30 pre parto, 3g de Rovimix  $\beta$ -caroteno<sup>®</sup> 10%, mezclado con el mineral, (equivalentes a 300 mg de  $\beta$ -caroteno).

Para reproducir el efecto de stress provocado por la inyección del tratamiento 1 ( $\beta$ -caroteno parenteral), las vacas del control y del tratamiento 2 ( $\beta$ -caroteno enteral) también recibieron una inyección intramuscular de 15 ml de solución fisiológica el día 30 post parto.

Todas las vacas fueron sometidas a un programa de inseminación artificial a partir del día 60 de lactación, el cual fue realizado por la misma persona, siguiendo el protocolo am-pm, donde la vaca que presentó el celo en la mañana fue inseminada ese mismo día en la tarde y la que presentó el celo en la tarde fue inseminada en la mañana del día siguiente. De igual forma a todas se les realizó un registro de parámetros reproductivo, indicando: retención de membranas fetales, número de inseminaciones necesarias para lograr la preñez e intervalo parto 1<sup>er</sup> Servicio.



**Figura 1:** Protocolos de alimentación con diferentes fuentes de  $\beta$ -caroteno.

*Control (sin suplementación de  $\beta$ -caroteno) Trat. 1 suplementadas de  $\beta$ -caroteno parenteral (Dalmavital®) y un Trat. 2 suplementadas con  $\beta$ -caroteno enteral (Rovimix  $\beta$ -caroteno®,  $\beta$ -caroteno 10%)*

#### Tomas de muestra de sangre:

A las 18 vacas se les realizó la toma muestra de sangre en la vena caudal, mediante el uso de vacutainer y tubos de ensayo con heparina. La sangre colectada se utilizó tanto en los análisis de progesterona como en los de  $\beta$ -caroteno en plasma.

Para el estudio hormonal, de las 18 vacas evaluadas, fueron seleccionadas 6 de manera aleatoria (obteniendo 2 vacas de cada tratamiento), las cuales fueron muestreadas a razón de 2 veces por semana para lograr obtener así el pico de progesterona en el ciclo estral de estos animales.

#### Análisis hormonal.

Las muestras de plasma sanguíneo fueron congeladas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para posteriormente ser procesada.

Las concentraciones progesterona se analizaron por medio de las copas comerciales ST AIA PACK PROGESTERONA II® marca TosohBioscience; realizando la medición mediante el equipo de inmunoensayo automatizado AIA-360®, según las indicaciones del fabricante.

Se realizó la calibración, el chequeo diario y los procedimientos de mantenimiento y uso de controles de diferente concentración (MultiAnalyte Control-MAC®, TosohBioscience) de conformidad a lo descrito en el “Manual del Usuario” provisto por la casa comercial.

El AIA 360® realiza la cuantificación de progesterona mediante un procedimiento de fluorescencia competitiva de inmunoabsorción ligado a enzimas, el cual se realiza en su totalidad en copas de muestras de un único uso, las cuales contienen todos los reactivos necesarios. Estas copas contienen perlas magnéticas impregnadas con anticuerpos y progesterona marcada con una enzima.

Al realizar la medición, la progesterona presente en la muestra, (plasma bovino), compite contra la hormona marcada por los sitios de unión de los anticuerpos presentes en las perlas magnéticas. Posteriormente, las perlas son lavadas para remover la hormona marcada no unida, se agrega el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil fosfato (4MUP) y se incuba. La cuantificación hormonal se obtiene mediante la medición de enzima unida a las perlas, la cual es inversamente proporcional a la concentración de progesterona en la muestra. Todo este procedimiento lo realiza el equipo mediante la toma de 75 µl, el cual toma de manera automatizada del carrusel de muestras.

Todo este procedimiento fue realizado en el laboratorio de fertilización in vitro de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional.

Análisis de β-caroteno en sangre.

Este se realizó en las 18 vacas destinadas al estudio, a razón de una vez por semana, durante 150 días (desde el día 30 preparto hasta el día 120 post parto).

El procedimiento se realizó mediante el uso del equipo iCheck© (BioAnalyt GmbH, Teltow, Alemania). Para ello se tomaron 400 µl de sangre del tubo de heparina, para luego ser introducidos y mezclados durante 10 segundos en el vial de iEx©, el cual por medio de un disolvente orgánico desnaturaliza, en un solo paso, el β-caroteno, para su posterior medición a través de un espectrofotómetro portátil. Este procedimiento, al ser portátil, se realizó al momento de la toma de muestra en la vaca, directamente en la explotación.

#### Análisis de $\beta$ -caroteno en calostro.

Esta se realizó en las 18 vacas, a las cuales se les efectuó una toma de muestra única, el día de parto; y por medio de la metodología oficial descrita por la AOAC 941.15 (2005) estas fueron analizadas en el laboratorio del CITA en la UCR.

#### Conteo de Células somáticas en leche.

Se realizó en las 18 vacas destinadas al estudio, efectuando una toma de muestra por semana, iniciando 1 semana después del parto y realizando una muestra completa de leche de todos los cuartos en producción.

Para su medición se usó un contador fluorofototelectrónico de células somáticas, Fossomatic 400<sup>©</sup>, el cual expresa los resultados en cél/ml<sup>4</sup>. Este análisis es realizado con la colaboración de los laboratorios de la Cooperativa de Productores de Leche Dos Pinos R.L.

#### Evaluación ginecológica mediante ultrasonido.

Al igual que los anteriores, se ha realizado en las 18 vacas, cada 15 días, iniciando 15 días posterior al parto, y continuando la evaluación hasta el día 120 post parto o hasta que se confirmó la gestación.

Para este se ha utilizado un ultrasonido Ibex pro, con un transductor lineal de 5MHz, el cual permitió realizar la evaluación y la medición de los folículos o del cuerpo lúteo presente, dependiendo del punto en el ciclo estral en el que se encuentre el animal al momento de la evaluación.

#### Análisis Estadístico.

Los datos obtenidos en este experimento se presentan como  $\pm$  media del error estándar y fueron sometidos a análisis de la varianza (ANOVA) y se calcularon las diferencias entre tratamientos por medio de test de Tukey y Chi cuadrado. Todos los cálculos se llevaron a cabo utilizando un sistema de análisis estadístico R 2.15.0, por medio de la aplicación Rcmdr 1.9-6 y el ANOVA de múltiples factores.



## Resultados y Discusión.

Niveles de  $\beta$ -caroteno en sangre.

Los bovinos, a diferencia de otros rumiantes (como ovejas y cabras) son capaces de absorber cantidades significativas de  $\beta$ -caroteno de la dieta y, debido a que no todo el  $\beta$ -caroteno absorbida se transforma en vitamina A, el excedente se deposita en los tejidos adiposos del cuerpo o es secretada en la grasa láctea. Heucken (1992) citado por Mora *et al.*, 1999, Larson *et al.*, 1993 y Yang *et al.*, 1993. De igual forma Yang *et al.*, (1992) y Knight *et al.*, (1993) notaron que el  $\beta$ -caroteno es el principal carotenoide detectado en el suero y tejido adiposo de ganado; representa el 85-90% del color del tejido adiposo en bovinos.

Para la degradación de los carotenoides primero debe ocurrir la degradación de la matriz vegetal que deposite el carotenoide en la fase líquida del rumen. El grado de degradación de los carotenoides por los microorganismos del rumen es todavía vago, porque los resultados, principalmente de  $\beta$ -caroteno, difieren en una amplia medida (Nozière *et al.*, 2006). En este aspecto Dawson y Hemington (1974) no encontraron ninguna degradación en su experimento mientras que Davison y Seo (1963), citado por Vogdanou, (2014), informaron de una degradación moderada, en torno al 10-25%, la cual comienza con el transporte de los carotenoides disponibles en la linfa y plasma. Posteriormente ocurre su metabolismo dentro de los tejidos (conversión en vitamina A y la utilización como antioxidantes), para ser posteriormente almacenado en el tejido adiposo o ser secretado en la bilis desde el hígado (Nozière *et al.*, 2006). En el caso de su conversión a vitamina A puede tener lugar en el hígado, sin embargo, ocurre con mayor frecuencia en la mucosa intestinal, donde en el caso de los rumiantes son capaces de convertir 6 mg  $\beta$ -caroteno en 1 mg de retinol. (McDonald *et al.*, 2011).

La concentración de  $\beta$ -caroteno en sangre se ve afectada directamente por la vía de suplementación, sufriendo estas un incremento de 18% en aquellas vacas suplementadas de forma enteral con  $\beta$ -caroteno, en comparación a la vía parenteral, siendo este último un 30% superior al control; mientras que aquellas que no recibieron ningún suplemento (control) fueron las que presentaron, en promedio, la menor concentración (cuadro 2).

**Cuadro 2:** Efecto de la suplementación de  $\beta$ -caroteno enteral o parenteral, sobre las concentraciones de  $\beta$ -caroteno en sangre ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ ).

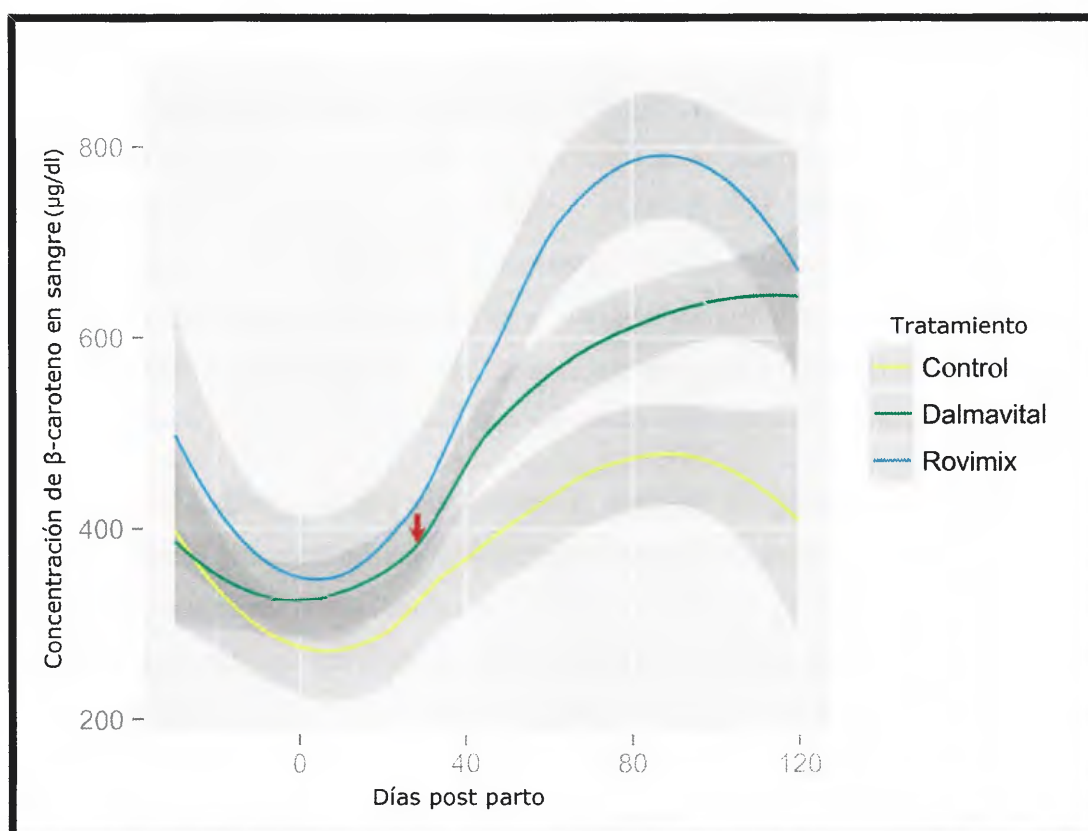
<i>Tratamiento</i>	<i>Concentración de B-Caroteno en sangre</i>		
	N	Media $\pm$ DS	P
<i>Control</i>	6 X 21	375,21 <sup>a</sup> $\pm$ 177,47	
<i><math>\beta</math>-caroteno parenteral</i>	6 X 21	485,11 <sup>b</sup> $\pm$ 182,28	< 0,001
<i><math>\beta</math>-caroteno enteral</i>	6 X 21	573,68 <sup>c</sup> $\pm$ 275,34	

Prueba de Tukey, letras diferentes indican diferencia entre tratamientos. ( $p = 4,62\text{e-}11$ )

En la figura 2 se aprecia el comportamiento de las concentraciones de  $\beta$ -caroteno en las diferentes etapas del parto y post parto, evidenciando que desde el parto los animales suplementados con  $\beta$ -caroteno enteral presentaron una concentración plasmática promedio superior, evidenciando que la absorción y biodisponibilidad de este producto es alta (incrementando rápidamente la concentración de  $\beta$ -caroteno en plasma). En este sentido Kalamun *et al.*, (2012), mencionaron que un suplemento dietético de  $\beta$ -caroteno en una forma purificada a las vacas lecheras, escapa de la degradación completa en el rumen, aumentando así las concentraciones circulantes; sin afectar así las funciones metabólicas una vez retirado el suplemento (figura 2).

Por otro lado, todas las vacas evaluadas presentaron una reducción en las concentraciones de  $\beta$ -caroteno en sangre al momento del parto, incrementándose conforme avanza la vaca en la etapa de lactación. En este sentido Johnston y Chew, (1984), notaron que las concentraciones plasmáticas de  $\beta$ -caroteno decrecen durante el periodo seco, y alcanzan el punto más bajo cerca del día 4 ó 6 postparto. Situación que Oliveira *et al.*, (2015) comparte, al notar que la suplementación enteral de  $\beta$ -caroteno durante el parto, aumentó la concentración de este en sangre durante el post parto (figura 2).

Durante todo el estudio se notó que las vacas tratada con  $\beta$ -caroteno enteral presentaron una concentración mayor de  $\beta$ -caroteno en sangre. Mientras que el grupo tratado con  $\beta$ -caroteno parenteral incremento las concentraciones sanguíneas  $\beta$ -caroteno después de su aplicación (al día 30 post parto); logrando tener un valor estadísticamente igual a las tratadas con  $\beta$ -caroteno enteral entre los días 31 y 60 post parto. En contraste, el grupo control fue el que mantuvo siempre la menor concentración sanguínea de  $\beta$ -caroteno; destacando que todos los grupos evaluados presentaron valores promedios superiores a 300  $\mu\text{g/dl}$  (figura 2).



**Figura 2:** Efecto de la suplementación de  $\beta$ -caroteno sobre las concentraciones de  $\beta$ -caroteno en sangre ( $\mu\text{g/dl}$ ) y sus variaciones durante el pre parto y post parto.

Las bajas concentraciones de  $\beta$ -caroteno, propias del parto, podrían ocasionar problemas reproductivos posteriormente; debido a que las concentraciones sanguíneas de  $\beta$ -caroteno durante este periodo podrían estar relacionadas con mecanismos que producen la primera

ovulación post parto, provocando así un pobre índice ovulatorio en la primera onda folicular post parto (Kawashima *et al.*, 2009). Sin embargo, al observar los resultados obtenidos en este experimento, al día 120 post partos no existieron diferencia significativa entre las concentraciones sanguíneas de  $\beta$ -caroteno de aquellas vacas suplementadas con  $\beta$ -caroteno enteral y las tratadas con  $\beta$ -caroteno parenteral. Esto se debe a que el grupo tratado con  $\beta$ -caroteno parenteral presentan una mejor persistencia en la curva posterior a su aplicación, logrando alcanzar niveles estadísticamente iguales a los obtenidos con el grupo tratado con  $\beta$ -caroteno enteral, el cual tuvo una disminución en las concentraciones sanguíneas al pasar los 90 días post parto (figura 2). De igual forma los tres tratamientos presentaron concentraciones medias de  $\beta$ -carotenos en sangre superiores a 300  $\mu\text{g}/\text{dl}$ , concentraciones que Can *et al.*, (1986) y Puis (1994), (citados por Quintela *et al.*, 2008), consideradas óptimas, según un estudio realizado en Francia. De igual forma Herdt y Stowe (1991), citados por Lindqvist, (2012), reportaron que una concentración de  $\beta$ -caroteno y/o retinol por encima de 300  $\mu\text{g}/\text{dl}$  sería lo deseable, considerándose un nivel inferior a 150  $\mu\text{g}/\text{dl}$  de retinol como deficiente, situación que no se experimentó en este estudio pues las vacas de dos grupos (tratadas con  $\beta$ -caroteno enteral o parenteral), presentaron concentraciones promedio superiores a los 300  $\mu\text{g}/\text{dl}$  (figura 2).

Al observar el cuadro 3 se nota que durante el pre parto los animales suplementados con  $\beta$ -caroteno enteral presentaron una concentración sanguínea de  $\beta$ -caroteno superior al grupo control. Posteriormente (entre los días 31 y 60 post parto) el grupo suplementado con  $\beta$ -caroteno parenteral presentó un incremento significativo en las concentraciones sanguíneas de  $\beta$ -caroteno, esto debido a que el día 30 post parto esas recibieron una dosis de  $\beta$ -caroteno. De igual forma el grupo control, entre el día 61 y 90 post parto, presentó un incremento en las concentraciones sanguíneas de  $\beta$ -caroteno, alcanzando valores estadísticamente similares a los obtenidos en el grupo de  $\beta$ -caroteno parenteral; mientras que en la última etapa de estudio (entre el día 91 y 120 post parto) se pudo notar que el grupo control obtuvo la menor concentración sanguínea, mientras que el grupo tratado con  $\beta$ -caroteno parenteral y  $\beta$ -caroteno enteral mantuvieron concentraciones sanguíneas de  $\beta$ -caroteno estadísticamente iguales y superiores al grupo control.

**Cuadro 3:** Efecto de la suplementación de  $\beta$ -caroteno enteral o parenteral, sobre las concentraciones de  $\beta$ -caroteno en sangre ( $\mu\text{g/dl}$ ), separados por etapas post parto (cada 30 días).

<i>Etapa</i>	<i>Tratamiento</i>	<i>Concentraciones de <math>\beta</math>-caroteno en Sangre (<math>\mu\text{g/dl}</math>)</i>		
		N	Media $\pm$ DS	P
<i>I</i> <i>Preparto</i>	Control	6 X 4	336,73 <sup>a</sup> $\pm$ 100,64	
	$\beta$ -caroteno parenteral	6 X 4	369,21 <sup>ab</sup> $\pm$ 126,41	< 0,05
	$\beta$ -caroteno enteral	6 X 4	417,77 <sup>b</sup> $\pm$ 111,69	
<i>II</i> <i>0 a 30</i> <i>post parto</i>	Control	6 X 4	268,81 <sup>a</sup> $\pm$ 60,69	
	$\beta$ -caroteno parenteral	6 X 4	310,73 <sup>ab</sup> $\pm$ 68,44	< 0,01
	$\beta$ -caroteno enteral	6 X 4	365,63 <sup>b</sup> $\pm$ 132,08	
<i>III</i> <i>31 a 60</i> <i>post parto</i>	Control	6 X 4	298,75 <sup>a</sup> $\pm$ 130,13	
	$\beta$ -caroteno parenteral	6 X 4	515,27 <sup>ab</sup> $\pm$ 165,36	< 0,01
	$\beta$ -caroteno enteral	6 X 4	588,71 <sup>b</sup> $\pm$ 215,41	
<i>IV</i> <i>61 a 90</i> <i>post parto</i>	Control	6 X 4	461,70 <sup>a</sup> $\pm$ 253,57	
	$\beta$ -caroteno parenteral	6 X 4	584,64 <sup>a</sup> $\pm$ 155,15	< 0,001
	$\beta$ -caroteno enteral	6 X 4	759,54 <sup>b</sup> $\pm$ 282,97	
<i>V</i> <i>91 a 120</i> <i>post parto</i>	Control	6 X 4	458,21 <sup>a</sup> $\pm$ 238,55	
	$\beta$ -caroteno parenteral	6 X 4	640,18 <sup>b</sup> $\pm$ 129,31	< 0,001
	$\beta$ -caroteno enteral	6 X 4	739,56 <sup>b</sup> $\pm$ 309,99	

Prueba de Tukey, letras diferentes indican diferencia entre tratamientos.

**Valores de p:**

- Etapa I: p=0,0385
- Etapa II: p=0,0009
- Etapa III: p=0,0012
- Etapa IV: p=0,0371
- Etapa V: p=0,0007

Niveles de Progesterona en sangre.

La administración de  $\beta$ -caroteno, tanto enteral como parenteral produjo un incremento las concentraciones sanguíneas de progesterona, siendo la concentración más alta en aquellas vacas que recibieron  $\beta$ -caroteno enteral (cuadro 4). Esta situación difiere de lo reportado por Kaewlamun *et al.*, (2011), quienes no observaron un incremento en las concentraciones sanguíneas de progesterona en aquellas vacas suplementadas con  $\beta$ -caroteno.

Quintela *et al.*, (2008) indica que las bajas concentraciones de progesterona durante la gestación son consideradas un factor de gran importancia en el mantenimiento de la gestación y en el crecimiento embrionario adecuado; razón por la cual se pudiera afirmar que una mayor concentración de progesterona puede causar una reducción en la incidencia de pérdidas embrionaria temprana.

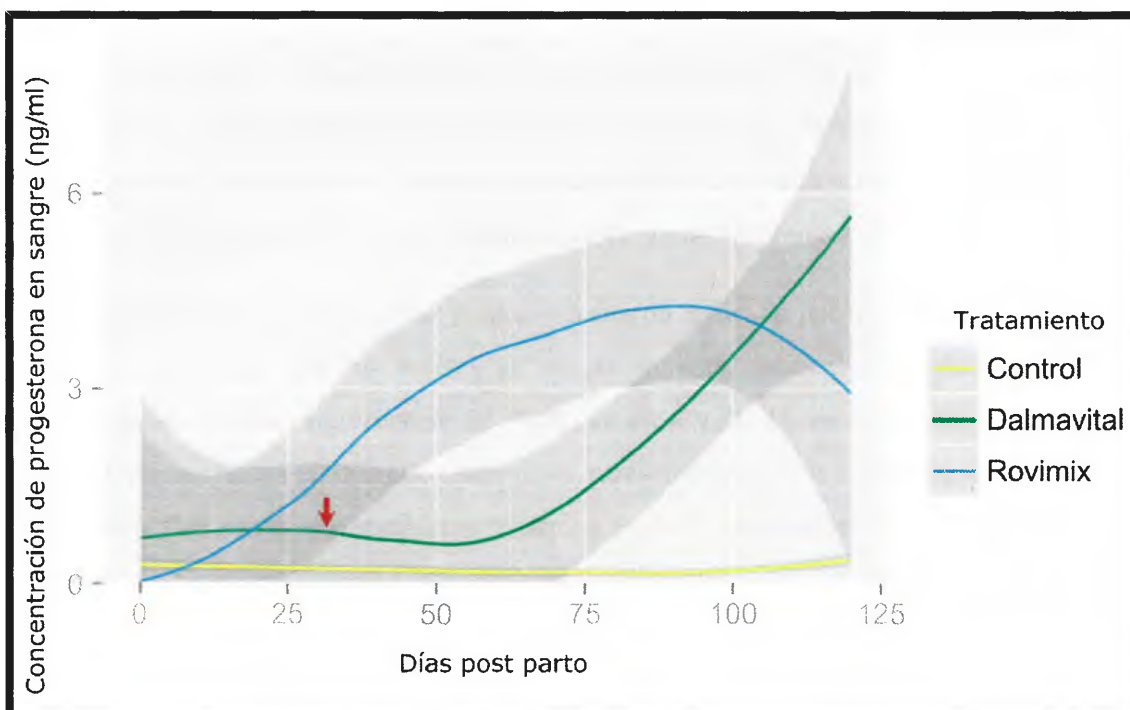
**Cuadro 4:** Efecto de la suplementación de  $\beta$ -caroteno enteral y parenteral, sobre las concentraciones de progesterona en sangre ( $\eta\text{g/ml}$ ).

<i>Tratamiento</i>	<i>Concentraciones de progesterona en sangre</i>		
	N	Media $\pm$ DS	P
<i>Control</i>	2 X 32	0,22 <sup>a</sup> $\pm$ 0,15	
<i><math>\beta</math>-caroteno parenteral</i>	2 X 32	1,65 <sup>b</sup> $\pm$ 2,65	< 0,001
<i><math>\beta</math>-caroteno enteral</i>	2 X 32	2,71 <sup>c</sup> $\pm$ 2,89	

Prueba de Tukey, letras diferentes indican diferencia entre tratamientos. ( $p = 9,5e^{-11}$ )

Las concentraciones de progesterona, superior a 5  $\eta\text{g/ml}$  indican que el animal se encuentra en fase luteal, mientras que concentraciones inferiores indican que se encuentra en fase folicular. Al evaluar los valores de las vacas se nota que ambas vacas tratadas con  $\beta$ -caroteno enteral presentaron picos de progesterona primero que las vacas de los otros dos tratamientos, indicando una pronta reactivación del sistema reproductivo. De igual forma, las vacas control no presentaron valores superiores a 5  $\eta\text{g/ml}$  en ningún punto. Al observar la figura 3 se nota que

después del día 30 post parto se incrementó de forma drástica las concentraciones de progesterona en sangre, con la administración de  $\beta$ -caroteno parenteral, el cual es de rápida biodisponibilidad y es transformado rápidamente en progesterona, para cubrir los requerimientos del animal de esta hormona.



**Figura 3:** Efecto de la suplementación de  $\beta$ -caroteno sobre las concentraciones de progesterona en sangre (ng/ml) y sus variaciones durante el post parto.

La adición de  $\beta$ -caroteno enteral fue capaz de mantener, en promedio, una concentración de progesterona en sangre superior a los otros dos grupos; esto debido a que la administración fue realizada de forma continua, desde el preparto (figura 3). Por otro lado, el grupo tratado con  $\beta$ -caroteno parenteral, no produjo un incremento inmediato de las concentraciones promedio de progesterona, pues presentó posteriormente valores similares al control hasta el día 60, 30 días posterior a su administración IM, donde presentaron un incremento significativo. Este incremento en los niveles de progesterona pudo deberse al aprovechamiento de  $\beta$ -caroteno por parte del cuerpo lúteo, como lo expresaron Grave-Hoagland *et al.*, (1988), quienes reportaron

una relación positiva entre los niveles de  $\beta$ -caroteno en plasma y la progesterona producida por las células del cuerpo lúteo.

Al observar de forma detallada las concentraciones de progesterona en la figura 3, se nota que a los 60 días existe una mayor concentración en aquellas vacas que consumieron  $\beta$ -caroteno enteral, si se compara con las tratadas con  $\beta$ -caroteno parenteral o el control. Esto pudiera permitir un adecuado reconocimiento de la gestación en este momento (momento deseado de inseminación y preñez de las vacas en producción lechera). Esto debido a que esta hormona es la encargada de garantizar una adecuada implantación en la vaca y evitar así un nuevo ciclo estral en esta, lo cual provocaría una pérdida embrionaria temprana.

Respuestas similares al administrar  $\beta$ -caroteno fueron indicada por Trojačanec *et al.*, (2012), quienes mencionaron que los niveles en sangre de este, antes de la inducción del estro, presentaron un aumento significativo ( $P < 0,05$ ) en día 4 y día 11, en comparación con el grupo que únicamente recibió 50.000 IU. vitamina A intra-muscular y los controles; mientras que, en la fase lútea, las vacas que recibieron vitamina A en el tratamiento demostraron niveles de progesterona significativamente mayores en comparación con las vacas control y las que recibieron únicamente el  $\beta$ -caroteno en la dieta.

Trojačanec *et al.*, (2013), notaron que la suplementación de  $\beta$ -caroteno podría mejorar el desarrollo de tejidos lútea, así como la producción de progesterona solamente en animales con déficit significativo de  $\beta$ -caroteno ( $171,825 \pm 1,039 \mu\text{g/dl}$ ). Por otra parte, la vitamina A como un agente terapéutico primario en combinación con  $\beta$ -caroteno tiene efecto más fuerte en los parámetros de reproducción que  $\beta$ -caroteno solo. Si embargo en el presente estudio las vacas presentaron valores superiores ( $375 \pm 177 \mu\text{g/dl}$ ), condición que pudo afectar el cambio en la respuesta hormonal de las vacas, observando valores superiores en la concentración promedio de progesterona a pesar de superar el valor crítico reportado anteriormente.

Efecto del  $\beta$ -caroteno sobre los parámetros reproductivos.

Como se pudo notar en el capítulo anterior, las vacas que recibieron un aporte de  $\beta$ -caroteno enteral y parenteral alcanzaron concentraciones de progesterona mayores, esto debido a que el cuerpo lúteo contiene altas concentraciones de este compuesto, por lo que se pudo haber



generado un mejor desarrollo del cuerpo lúteo. Pethes *et al.*, (1985), citado por Trojačanec *et al.*, (2012), mencionan que la deficiencia de  $\beta$ -caroteno y vitamina A produjeron una duración prolongada del estro, un retraso en la ovulación, y en el desarrollo del cuerpo lúteo, posiblemente debido a bajos niveles de progesterona, con una mayor incidencia de quistes ováricos; provocando una baja tasas de concepción y abortos en la preñez temprana. Jukola *et al.*, (1996), reportaron disminución de los signos externos del estro y la fertilidad en vacas con deficiencia  $\beta$ -caroteno; considerando, en ambos casos, niveles de  $\beta$ -caroteno inferiores a 200  $\mu\text{g}/\text{dl}$  como deficientes.

Esta condición de mayor concentración de progesterona en sangre pudiera afectar de manera positiva en la adecuada instauración del embrión, pudiendo así garantizar la gestación antes del día 120 post parto. Sin embargo, al observar el cuadro 5, se nota que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos, aunque el 50% de las vacas tratadas con  $\beta$ -caroteno enteral quedaron preñadas antes de los 120 días, superior al 33% y 16% obtenido por el grupo tratado con  $\beta$ -caroteno parenteral y control, respectivamente. Aguiar y Rojas, (2015), observaron que vacas con valores en sangre superiores a 5,87 mg/ml (587  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ) tuvieron un mayor índice de preñez, si se compara con las vacas que presentaron concentraciones promedias de 4,31 mg/ml (431  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ), teniendo un mejor índice aquellas que contenían una concentración superior de  $\beta$ -caroteno.

En la presente investigación el nivel inferior de  $\beta$ -caroteno en sangre lo obtuvo el grupo control con 375  $\mu\text{g}/\text{dl}$ , lo que podría explicar el bajo comportamiento reproductivo de este grupo, con solo un 17% de las vacas preñadas a los 120 días. Por otro lado, los grupos que recibieron  $\beta$ -caroteno parenteral y enteral presentaron concentraciones en sangre de 485  $\mu\text{g}/\text{dl}$  y 573  $\mu\text{g}/\text{dl}$  respectivamente, obteniendo los mayores porcentajes de preñez de 33% y 50% respectivamente, aunque estadísticamente no observo efecto de los tratamientos sobre la preñez a los 120 días (cuadro 5).

**Cuadro 5:** Efecto de la suplementación de  $\beta$ -caroteno enteral y parenteral, sobre la preñez a los 120 días post parto.

<i>Tratamiento</i>	<i>Vacas Preñez a los 120 días</i>			
	N	SÍ	No	P
<i>Control</i>	6	1 <sup>a</sup>	5	
<i><math>\beta</math>-caroteno parenteral</i>	6	2 <sup>a</sup>	4	0,47
<i><math>\beta</math>-caroteno enteral</i>	6	3 <sup>a</sup>	3	

Test de independencia Chi-cuadrado, letras diferentes indican diferencia entre tratamientos.

Los resultados obtenidos en este estudio no se comparan a los obtenidos por Goto *et al.*, (1989) quienes evaluaron vacas super ovuladas y obtuvieron una mejor calidad y supervivencia embrionaria en aquellas vacas que presentaron niveles plasmáticos de  $\beta$ -carotenos por encima de 200  $\mu\text{g}/\text{dl}$ , por lo que estas tenían mayor posibilidad de desarrollar una gestación pronta en el post parto (antes de los 120 días). Sin embargo, Shaw *et al.*, (1995), observaron que las vacas no produjeron mayor número de óvulos al ser suplementadas con vitamina A durante el inicio del proceso de súper ovulación, aunque las tratadas lograron un mayor número de óvulos transferibles totales, y de mejor calidad, al compararla con las vacas que no recibieron este suministro.

Arechiga *et al.*, (1998), citado por Oliveira *et al.*, (2015) y De Ondarza *et al.*, (2009), han observado una respuesta positiva en la fertilidad de vacas lecheras en lactancia y en su rendimiento al ser suplementada con 400mg/d de  $\beta$ -caroteno después del parto. Mientras que Trojačanec *et al.*, (2012), reportaron un porcentaje de preñez de 46,7% sin variaciones significativas entre los grupos suplementados con 200 mg  $\beta$ -caroteno (vía parenteral) y el control. Sin embargo, este mismo autor logró evidenciar una correlación entre la concentración sérica de  $\beta$ -caroteno en la inseminación y las concentraciones de progesterona  $r = 0,33$  ( $P < 0,05$ ) y la tasa de concepción  $r = 0,39$  ( $P < 0,01$ ), y las concentraciones séricas de  $\beta$ -caroteno en día 7 de la fase lútea y las concentraciones de progesterona  $r = 0,51$  ( $P < 0,01$ ).

Es posible que la mejora reproductiva en este caso no se haya evidenciado debido al número de repeticiones empleadas en cada tratamiento, puesto a que la limitación propia de la explotación no permitió el empleo de más animales en el estudio. Sin embargo, Lotthammen *et al.*, (1976), citado por Trojačanec *et al.*, (2012), llegaron a la conclusión que el déficit extremo de  $\beta$ -caroteno, pudiera ser causa de problemas de fertilidad.

Iwańska y Strusińska, (1997), determinaron un efecto positivo sobre la tasa de preñez, al suplementar vacas con  $\beta$ -caroteno y vitamina A, siempre que estas tengan un sistema reproductivo sano.

#### **Intervalo parto-primer servicio.**

Durante el estudio se llevó el control reproductivo de todas las vacas, en este se registró la fecha de parto y de primer servicio de cada uno de los animales involucrados. Para realizar el servicio era necesario que la vaca tuviera un moco vaginal completamente cristalino, pues de lo contrario no es recomendable realizar el servicio de esta.

Al observar los resultados resumidos en el Cuadro 6, se nota que no existe diferencia significativa entre las vacas; sin embargo, las vacas tratadas con  $\beta$ -caroteno enteral presentaron en promedio un menor número de días a primer servicio (81,67) si se compara con 128,17 y 93 obtenidos por las vacas tratadas con  $\beta$ -caroteno parenteral y control respectivamente.

El  $\beta$ -caroteno puede ayudar en la adecuada involución uterina, beneficiando mediante sus bondades antioxidantes inmunológicas, la reactivación normal uterina y la producción de un moco vaginal cristalino más rápidamente, aunque no hubo presencia de vacas con retención de membranas fetales. En este sentido, Kaewlamun *et al.*, (2011) lo explica al notar que al administrar 1g/vaca /día de  $\beta$ -caroteno reduce significativamente la hidroxiprolina sanguínea (un indicador de la involución uterina) y tuvo un efecto positivo en el porcentaje de leucocitos polimorfonucleares tanto en el útero como en el cuello uterino en comparación con las vacas de control. Esto último refleja una mejor salud uterina, beneficiando el comportamiento reproductivo.

Akordor *et al.*, (1986), concluyeron que el  $\beta$ -caroteno corrige anomalías en la fertilidad, si se cumplen los requerimientos de vitamina A. Sin embargo, Oliveira *et al.*, (2015), notaron que la

suplementación 1,2 g/vaca/día de  $\beta$ -caroteno no afectó la proporción de vacas preñadas al primer servicio, a los 90 y 150 días post parto, ni la proporción de vacas con contenido de progesterona sérica por encima de 1 ng/ml a las 21 y 42 días post parto.

**Cuadro 6:** Efecto de la suplementación de  $\beta$ -caroteno enteral o parenteral, sobre las en intervalo parto-1er servicio (días).

<i>Tratamiento</i>	<i>Intervalo parto 1er servicio</i>		
	N	Media $\pm$ DS	P
<i>Control</i>	6	93 <sup>a</sup> $\pm$ 35,84	
<i><math>\beta</math>-caroteno parenteral</i>	6	128,17 <sup>a</sup> $\pm$ 68,25	0,25
<i><math>\beta</math>-caroteno enteral</i>	6	81.67 <sup>a</sup> $\pm$ 33,08	

Prueba de Tukey, letras diferentes indican diferencia entre tratamientos.

#### **Efecto sobre el diámetro uterino y tamaño de cuerpo lúteo.**

Todas las vacas fueron evaluadas ginecológicamente mediante ultrasonido trasrectal, realizados cada 15 días desde el momento del post parto.

En este proceso se midió el cuerpo lúteo de mayor tamaño observado al momento del ultrasonido, y el diámetro del cuerno uterino (igualmente, tomando en cuenta el de mayor diámetro).

Al observar el cuadro 7, se nota que no existió diferencia significativa entre los diámetros de cuerpos lúteos; sin embargo, el diámetro promedio de las vacas tratadas con  $\beta$ -caroteno enteral fue mayor numéricamente, si se compara con el de las vacas tratadas con  $\beta$ -caroteno parenteral y control. No obstante, Trojačanec *et al.*, (2013), reportaron que la suplementación con vitamina A, con o sin la adición de  $\beta$ -caroteno, dio como resultado aumentos significativos en el tamaño del cuerpo lúteo y la concentración sérica de progesterona ( $P < 0,05$  y  $P < 0,01$ , respectivamente) en comparación con aquellas vacas suplementadas únicamente con  $\beta$ -caroteno y los controles.

En la presente investigación, al observar las concentraciones de progesterona (Cuadro 4), se nota que las vacas tratadas con  $\beta$ -caroteno enteral presentaron una mayor concentración de este, posiblemente sintetizada a partir de un cuerpo lúteo que contenía mayor concentración de  $\beta$ -caroteno, proveniente de la suplementación, aunque su tamaño no sea significativamente mayor.

**Cuadro 7:** Efecto de la suplementación de  $\beta$ -caroteno enteral o parenteral en el diámetro del cuerpo lúteo (mm).

<i>Tratamiento</i>	<i>Tamaño de cuerpos lúteos en mm</i>		
	N	Media $\pm$ DS	P
<i>Control</i>	6 X 4	12,74 <sup>a</sup> $\pm$ 3,23	0,305
<i><math>\beta</math>-caroteno parenteral</i>	6 X 4	13,41 <sup>a</sup> $\pm$ 5,03	
<i><math>\beta</math>-caroteno enteral</i>	6 X 4	15,00 <sup>a</sup> $\pm$ 6,17	

Prueba de Tukey, letras diferentes indican diferencia entre tratamientos.

Como se observa en el Cuadro 8, al realizar mediciones seriadas de los cuernos uterinos de las vacas, se nota que no existió diferencia significativa entre estas, aunque al igual que lo observado en el anterior indicador, el diámetro de aquellas vacas tratadas con  $\beta$ -caroteno enteral fue mayor, si se compara con aquellas vacas tratadas  $\beta$ -caroteno parenteral y control. Esto pudiera deberse a las mayores concentraciones de progesterona, generando un incremento en el diámetro de los cuernos uterinos, propio de diestro, etapa de ciclo estral donde se instaura la gestación.

**Cuadro 8:** Efecto de la suplementación de  $\beta$ -caroteno enteral o parenteral, sobre el diámetro uterino (mm).

<i>Tratamiento</i>	<i>Diámetro uterino en mm</i>		
	N	Media $\pm$ DS	P
<i>Control</i>	6 X 4	23,33 <sup>a</sup> $\pm$ 5,14	
<i><math>\beta</math>-caroteno parenteral</i>	6 X 4	23,84 <sup>a</sup> $\pm$ 5,01	0,443
<i><math>\beta</math>-caroteno enteral</i>	6 X 4	25,18 <sup>a</sup> $\pm$ 5,06	

Prueba de Tukey, letras diferentes indican diferencia entre tratamientos.

Niveles de  $\beta$ -caroteno en Calostro.

El primer paso para la transferencia de vitaminas liposolubles de la alimentación a la leche es la absorción en el intestino delgado, la cual se produce a través de difusión pasiva, y es compatible con el aumento de la cantidad de grasa en la dieta. Los carotenoides y tocoferoles se incorporan en los quilomicrones; para después ser transportado en forma de  $\beta$ -caroteno y tocoferoles por lipoproteínas de baja densidad, Cohn *et al.*, (1992) citado por Vogdanou, (2014) y Jensen *et al.*, (1999). Por último, éstos deben ser transportados de las lipoproteínas del plasma en una solución de grasa de la leche, sin embargo, estos mecanismos son poco conocidos, teniendo claro únicamente que sólo una ligera concentración de las vitaminas, incluido en la alimentación, se secreta en la leche en la etapa final (Jensen *et al.*, 1999).

De acuerdo con Yang y Tume, (1993), citado por Puppel *et al.*, (2013), para que el  $\beta$ -caroteno se convierta en retinol debe someterse a ciertos procesos químicos. Suplementación con 500g/día de linaza variedad Szafir acelera significativamente este proceso y resulta en el aumento de las vitaminas en la leche (Puppel *et al.*, 2013). Sin embargo, en el presente estudio las concentraciones de  $\beta$ -caroteno en el calostro no se vieron afectadas por la suplementación de este, en forma enteral. No obstante, al observar la media y las desviaciones estándar, se puede notar que las vacas tratadas con  $\beta$ -caroteno enteral presentan valores ligeramente superiores, con una desviación estándar inferior (Cuadro 9), lo cual pudiera indicar que la aplicación de  $\beta$ -

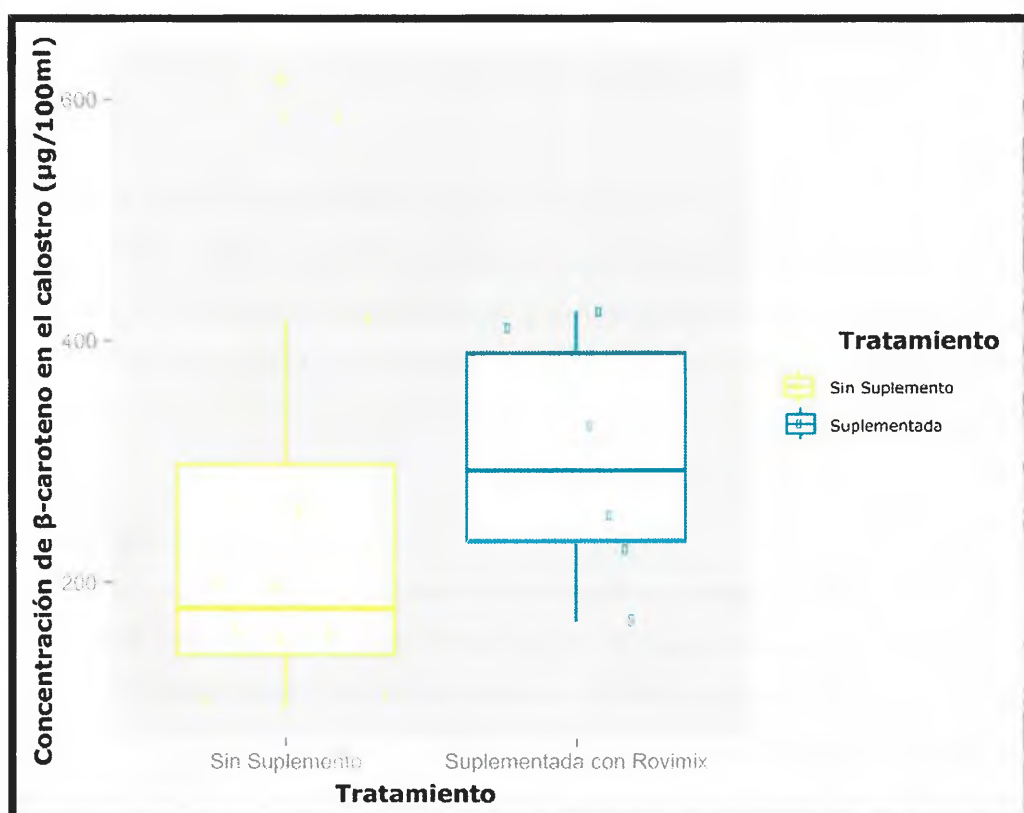
caroteno de forma enteral permite una mayor secreción en leche, brindando un mayor aporte de este al ternero, durante los primeros días, sobre todo al considerar los efectos que el  $\beta$ -caroteno tiene sobre el sistema inmune, como lo demostraron Chawla y Kaur (2004). Por ello se pudiera considerarse que al incrementar las concentraciones de  $\beta$ -caroteno en los terneros durante las primeras semanas de vida, obtendríamos una mejora en el porcentaje de supervivencia de estos, teniendo menor incidencia de enfermedades y un menor uso de antibióticos durante la primera etapa de vida; sin embargo, este estudio no evaluó esta variable.

La fuente  $\beta$ -caroteno en la dieta puede influir en su concentración en leche, lo que podría asociarse a los resultados obtenidos en este estudio. Según Nozière *et al.*, (2006), citado por Puppel *et al.*, (2013), los grupos con mayores niveles de  $\beta$ -caroteno, fueron aquellos que recibieron las semillas de linaza. Sin embargo, el nivel más alto se encontró en el grupo que recibió 500g/d de linaza variedad Opal, mientras que la más alta concentración de vitamina A en el grupo que recibió 500g/d de linaza variedad Szafi. En el presente estudio no se obtuvo una diferencia significativa entre los tratamientos (Cuadro 9), lo cual pudo deberse a que se utilizó  $\beta$ -caroteno sintético de forma enteral en vacas cuyo consumo de este era superior incluso a los 300mg/día, reflejando niveles en sangre superior a los 300  $\mu$ g/dl (valor mínimo permitido), regulando la secreción de este en leche, por lo cual las concentraciones en calostro no se vieron afectada con el tratamiento. Este comportamiento fue mencionado por Calderón *et al.*, (2007), quienes afirmaron que las concentraciones de  $\beta$ -carotenos totales en plasma dependen principalmente de los cambios estacionales, los cuales afectan las plantas, influyendo directamente la dieta de las vacas, lo cual puede generar alteraciones en la fisiología animal. No obstante, las concentraciones  $\beta$ -carotenos en leche sufrieron variaciones significativamente durante la producción; por lo que se pudiera considerar que la capacidad de filtrado de estos compuestos del plasma a la leche es regulada (Calderón *et al.*, 2007).

**Cuadro 9:** Efecto del tratamiento parto sobre el contenido de  $\beta$ -caroteno ( $\mu\text{g}/100\text{ml}$ ) en calostro del 1er día

<i>Tratamiento</i>	<i>Concentración <math>\beta</math>-caroteno en calostro</i>		
	N	Media $\pm$ DS	P
<i>Sin Suplemento de <math>\beta</math>-caroteno</i>	12	253,86 <sup>a</sup> $\pm$ 184,48	0,561
<i>Suplementadas con <math>\beta</math>-caroteno enteral</i>	6	302,37 <sup>a</sup> $\pm$ 103,07	

Prueba de Tukey, letras diferentes indican diferencia entre tratamientos.



**Figura 4:** Efecto de la suplementación de  $\beta$ -caroteno sobre la concentración de  $\beta$ -caroteno en el calostro ( $\mu\text{g}/100\text{ml}$ )

Una alta dosis diaria de vitaminas sintéticas durante el peri parto, aumenta la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en el plasma sanguíneo cuando se ofrece el suplemento. Sin embargo, no tuvo



ningún efecto sobre las concentraciones de vitaminas en la leche, en aquellas vacas que ya tenían altas concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol y  $\beta$ -caroteno natural en la dieta basal. Sin embargo, notó una concentración más alta de vitaminas en la leche de aquellas vacas alimentadas con ensilaje que contenía altas concentraciones de vitaminas; lo cual podrían tener un gran impacto de la salud del ternero; pues las crías nacen con pequeñas reservas de  $\alpha$ -tocoferol y  $\beta$ -caroteno, dependiendo de altas concentraciones en el calostro para aumentar los niveles plasmáticos de las vitaminas. Alimentar con ensilajes de mayor concentración  $\beta$ -caroteno y  $\alpha$ -tocoferol, por lo tanto, aumentaría los niveles de estos en el plasma de los terneros y podrían dar lugar a una reducción en la mortalidad estos (Lindqvist, 2012). No obstante, en este estudio no se notó un incremento significativo en las concentraciones de  $\beta$ -caroteno en el calostro, posiblemente debido a que las vacas ya cubrían los requerimientos de  $\beta$ -caroteno con la dieta basal, razón por la cual el suplemento pre parto no afectó de manera significativa su concentración en el calostro (Cuadro 9).

De igual forma existen suplementos energéticos capaces de reducir las concentraciones de  $\beta$ -caroteno en leche, como lo describió Vogdanou, (2014), quien demostró que la inclusión de semilla de canola aumentó la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en la leche, pero redujo el contenido de  $\beta$ -caroteno. En este sentido es importante evaluar si una dieta con altos contenidos de cascara de piña y residuo de cervecería en vacas secas es capaz de reducir la concentración de  $\beta$ -caroteno en el calostro.

#### Conteo de Células somáticas.

En cuanto al conteo de células somáticas en las vacas evaluadas, se realizó un total de 252 análisis. Durante este periodo se puede observar que las vacas tratadas con  $\beta$ -caroteno enteral presentaron un menor recuento de células somáticas, al compararla con aquellas tratadas con  $\beta$ -caroteno parenteral, sin embargo, al compararla con las vacas control no se observa una diferencia significativa entre ambas; aunque aquellas tratadas con  $\beta$ -caroteno enteral presentaron un conteo promedio menor con una desviación estándar menor, Cuadro 10. Esto puede deberse al efecto antioxidante del  $\beta$ -caroteno, descrito por Puppel *et al.*, (2013), que sugieren que los radicales libres han sido implicados en el desarrollo de más de 100 enfermedades que afectan a todos los órganos principales. En este sentido, a pesar de no haberse evidenciado una reducción

significativa en los conteos de células somáticas de las vacas control, comparadas con las suplementadas con tratadas con  $\beta$ -caroteno enteral, se puede considerar que la administración de un suplemento constante de  $\beta$ -caroteno pudiera contribuir en una mejora inmunológica de los animales, reflejando una mejor salud uterina, lo cual ayudara a reducir el conteo de células somáticas en leche.

**Cuadro 10:** Efecto de la suplementación de  $\beta$ -caroteno sobre las concentraciones de células somáticas en leche  $\text{LOG}_{10}$  (cél/ml).

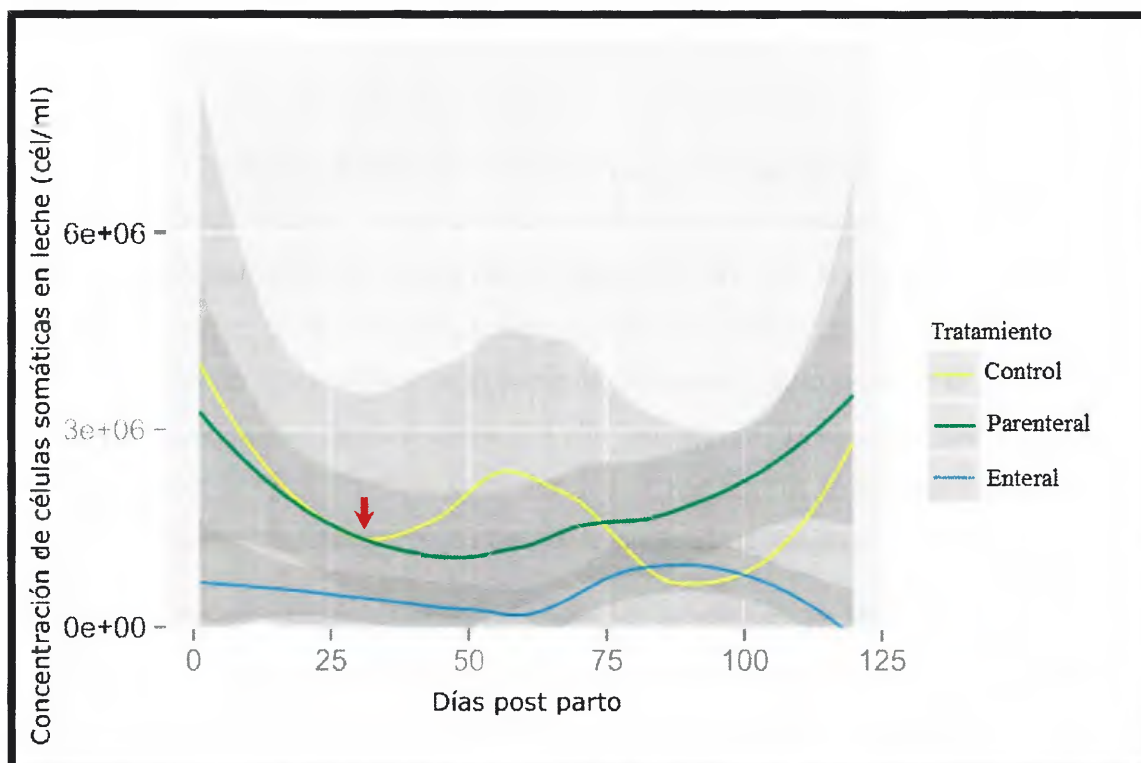
<i>Tratamiento</i>	<i>Conteo de células somáticas en leche (Log<sub>10</sub>)</i>		
	N	Media $\pm$ DS	P
<i>Control</i>	6 X 14	5,26 <sup>a</sup> $\pm$ 0,90	
<i><math>\beta</math>-caroteno parenteral</i>	6 X 14	5,76 <sup>b</sup> $\pm$ 0,82	< 0,001
<i><math>\beta</math>-caroteno enteral</i>	6 X 14	4,94 <sup>a</sup> $\pm$ 0,87	

Prueba de Tukey, letras diferentes indican diferencia entre tratamientos. ( $p = 3,09e^{-8}$ )

Valor de  $\text{Log}_{10}$  5,69 se considera valor aceptable de (cél/ml), equivalente a 500.000 células/ml

Chawla y Kaur (2004), observaron una disminución en la incidencia de mastitis clínica y subclínica en aquellas vacas suplementadas con vitamina E sola o con  $\beta$ -caroteno. No obstante, en este estudio se pudo notar que al comparar el control con las tratadas con  $\beta$ -caroteno parenteral, las medias de células somáticas/ml son similares, lo cual puede deberse a que una única aplicación de  $\beta$ -caroteno no genera el efecto esperado sobre el sistema inmunológico, a diferencia de una aplicación constante vía enteral, como ocurrió en aquellos animales tratados con  $\beta$ -caroteno enteral. Durante los 120 días post parto las vacas tratadas con  $\beta$ -caroteno enteral presentaron una mayor estabilidad en la salud de la ubre (figura 5). Esto pudiera ser debido al efecto que tiene el  $\beta$ -caroteno sobre el sistema inmune, mejorando así la respuesta inmunitaria de la ubre durante el período post parto. De igual forma se puede notar que las vacas de los otros dos tratamientos presentan conteos menos uniformes y la administración de  $\beta$ -

caroteno parenteral en el post parto no generó una aparente mejora en la salud de la ubre, puesto a que las medias de células somáticas/ml no presentaron una reducción aparente luego de la aplicación 30 días post parto.



\*La flecha roja indica el punto donde se inyectó el  $\beta$ -caroteno parenteral

**Figura 5:** Efecto de la suplementación de  $\beta$ -caroteno sobre las concentraciones de células somáticas (cél/ml) en leche durante el post parto.

Oliveira *et al.*, (2015), no notaron evidencia de respuestas positivas al suplementar 400g/d de  $\beta$ -caroteno en: la densidad de calostro, la producción de leche, y la concentración de grasa de la leche, aunque si se observó una débil tendencia a la reducción en la incidencia de conteo de células somáticas superiores a 200.000 células/ml en aquellas vacas multíparas suplementado el  $\beta$ -caroteno. De igual forma Bian *et al.*, (2007), citados por Oliveira *et al.*, (2015) y Wang *et al.*, (2013), han observado efectos positivos de la suplementación de  $\beta$ -caroteno antes del parto sobre la incidencia de la mastitis en vacas lecheras, situación se asemeja a la reportada por Chew

*et al.*, (1982) citado por Oliveira *et al.*, (2015), quienes mencionan una relación negativa entre resultados de los exámenes de California Mastitis Test (CMT) y la concentración de  $\beta$ -caroteno en plasma en vacas lecheras. Estos resultados sugieren que  $\beta$ -caroteno puede tener un papel en las enfermedades relacionadas con la inmunidad y la fertilidad en las vacas lecheras (Oliveira *et al.*, 2015).

#### Análisis Económico

Según Carazo (1984), las pérdidas por días abiertos a partir del día 90, promedian un valor de 4,97 litros leche/día abierto, lo cual al valor actual representaría una pérdida diaria de 2,68 US \$. Sin embargo, estos valores pudieran incrementarse en vacas de 4ta y 5ta lactancia, las cuales presentan una mayor producción láctea. Dichos valores se basaron en las curvas de producción de leche, la cual va decreciendo con el pasar de los meses y al extenderse el periodo seco se posterga el siguiente pico de producción. Por ello Monge, (1979), concluye que al prolongar el periodo vacío de la vaca se reduce la producción de por vida de esta, reduciendo a su vez la presión de selección de éstas por bajo número de animales de remplazo.

Al observar este incremento de costos, generado por un aumento en los días abiertos, podemos considerar, que reduciendo en 20 días el periodo abierto se cubrirían los gastos generados por el tratamiento de  $\beta$ -caroteno enteral; mientras que si se reduce en 1 los días abiertos se cubriría el tratamiento con  $\beta$ -caroteno parenteral; ambos a partir del día 90 port parto, sin embargo, las vacas tratadas con  $\beta$ -caroteno (enteral o parenteral) no presentaron mejora significativa en el índice de preñez a los 120 días.

Se igual forma, si bajo las condiciones de la explotación, se lograra obtener una mejora estadísticamente significativa del conteo de células somáticas (situación que no ocurrió en este estudio al compararlo con la control), esta mejora representaría un ingreso extra de 0,02 US \$ extra /Kg de leche producida, con lo cual el productor pudiera cubrir los gastos con tan solo la producción de 2.700 litros (con menor conteo de células somáticas), lo cual pudiera generar una vaca en los primeros 90 días de producción, tomando en cuenta un que el promedio de 29 litros/día durante este periodo, Cuadro 11.

**Cuadro 11:** Comparación económica del costo por tratamiento de  $\beta$ -caroteno enteral y  $\beta$ -caroteno parenteral expresado en \$US/vaca.

<i>Producto</i>	<i>Costo/Dosis</i>	<i>Días de tratamiento/Vaca</i>	<i>Inversión/animal</i>
<i><math>\beta</math>-Caroteno parenteral</i>	\$ 1,50	1	\$ 1,50
<i><math>\beta</math>-Caroteno enteral</i>	\$ 0,36	150	\$ 54,00

## **Conclusiones y recomendaciones**

La administración enteral del  $\beta$ -caroteno únicamente fue capaz de producir cambios significativos en: las concentraciones sanguíneas de progesterona y de  $\beta$ -caroteno, y en los conteos de células somáticas en leche durante los primeros 120 días post parto (si se compara con el grupo tratado con  $\beta$ -caroteno parenteral). Sin embargo, en todos los casos, se pudo notar que la administración enteral de  $\beta$ -caroteno fue capaz de incrementar los promedios de tamaños de cuerpos lúteos y cuernos uterinos, así como las concentraciones de este compuesto en calostro, aunque estadísticamente el cambio no fue significativo. Aunque estas diferencias no fueron significativas su igualdad estadística se pudo deber a los múltiples factores que actúan sobre estas variables, pudiendo existir elementos no controlados, los cuales afectaron estos resultados.

La administración parenteral de  $\beta$ -caroteno fue capaz de incrementar de forma significativa las concentraciones de este en sangre, por lo cual se considera que para las condiciones evaluadas en la finca El Milagro, la administración parenteral de  $\beta$ -caroteno no fue tan efectiva como la administración enteral.

Se pudo notar que la administración de  $\beta$ -caroteno enteral fue capaz de generar un incremento significativo en las concentraciones de progesterona en sangre; razón por la cual se podría esperar una mayor instauración de la gestación, aunque en este caso no se pudo obtener una diferencia estadísticamente significativa en la preñez a los 120 días, cuando las vacas fueron suplementadas; si se compara con las vacas control y las tratadas con  $\beta$ -caroteno parenteral. En este sentido la deficiencia de vitamina A también debe ser considerada en aquellos animales con bajos niveles de progesterona.

Al realizar un análisis de costos de los tratamientos se pudo notar que únicamente con la mejora en los conteos de células somáticas en leche, el  $\beta$ -caroteno enteral es viable; sin embargo antes de instaurar el uso de este producto en una explotación se recomienda evaluar si en cada caso este es capaz de expresar sus bondades y resulta económicamente viable su utilización; puesto a que como lo mencionan otros autores, la administración de  $\beta$ -caroteno es efectiva únicamente cuando no se cubren los requerimientos de vitamina A.

A pesar de que la administración parenteral de  $\beta$ -caroteno no fue capaz de reducir de forma significativa el conteo de células somáticas en leche, se recomienda repetir en próximos estudios esta evaluación con un mayor número de animales, evaluando los conteos somáticos por cuarto, pues al realizar un pool de la ubre (como se realizó en este estudio) puede incrementar de forma muy considerable el conteo de células somáticas en la muestra al solo tener afectado un cuarto de la ubre.

Por último, sería de interés científico repetir investigaciones similares para evaluar el efecto reproductivo del  $\beta$ -caroteno sobre un mayor número de animales, pues a pesar de que en este caso no se observó una respuesta significativa de este, el número de muestra fue muy bajo por limitaciones económicas y propias de la explotación, lo cual pudo afectar en estos resultados.

### **Literatura Citada.**

- AGUIAR, E., ROJAS, A. 2015. Variaciones de  $\beta$  caroteno en sangre de vacas lecheras durante el periodo post parto. *Nutrición Animal Tropical* 9 (2): 91-104
- AOAC. 2005. *Official method of analyst*. 18<sup>th</sup> editions. Ed. AOAC International, Virginia, EE.UU. pp 28-30.
- ARIKAN, Ş., RODWAY, R. 2001. Seasonal variation in bovine luteal concentrations of  $\beta$  - carotene. *Turk Journal Veterinary Animals Science*. 25: 165-168.
- BALLET, N., ROBERT, J., WILLIAMS, P. 2000. *Vitamins in forages*. Wallingford UK: CABI Publishing. Forage evaluation in ruminant nutrition.
- CALDERÓN, F., CHAUVEAU-DURIOT, B., MARTIN, B., GRAULET, B., DOREAU, M., NOZIÉRE, P. 2007. Variations in carotenoids, vitamins A and E, and color in cow's plasma and milk during late pregnancy and the first three months of lactation. *Journal of Dairy Science* 90:2335–2346.
- CARAZO, X. 1984. Análisis de las pérdidas de producción de leche por influencia de periodos abiertos mayores a 90 días. Tesis Ingeniería Agrónoma. San José, Costa Rica, UCR, Facultad de Agrónoma pp: 22-31
- CELI, P., DI TRANA, A., CLAPS, C. 2010. Effects of plane of nutrition on oxidative stress in goats during the peripartum period. *The Veterinary Journal*. 184: 95–99.
- CHAWLA, R., KAUR, H. 2004. Plasma antioxidant vitamin status of peri parturient cows supplemented with  $\alpha$  tocopherol and  $\beta$ carotene. *Animal Feed Science and Technology*. 114: 279-285.
- CHEW, B. 1987. Vitamin A and  $\beta$ -carotene in host defense. *Journal of Dairy Science*. 70: 2732–2743.
- DAWSON K., HEMINGTON N. 1974. Digestion of grass lipids and pigments in the sheep rumen. *British Journal Of Nutrition* 32:327-340.



- GOTO, K., KAJISA, O., EZOE, K., NAKANISHI, Y., OGAWA, K., TASAKI, M., OHTA, H., INOHAE, S., TATEYAMA, S., KAWABATA, T. 1989. Relationship between plasma beta carotene concentration and embryo quality in superovulated Japanese black cattle. *Memoirs of the Faculty of Agriculture Kagoshima University*. 25:113-117.
- GRAVE-HOAGLAND, R., HOAGLAND, T., WOODY, C. 1988. Effects of  $\beta$ -carotene and vitamin A on progesterone production by bovine luteal Cells. *Journal of Dairy Science*. 71:1058-1062.
- GUERIN, P., MOUATASSIM, S., MENEZO, Y. 2001 Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human Reproduction Update*. 7: 175-189.
- JOHNSTON, L., CHEW, B. 1984. Peripartum changes of plasma and milk vitamin A and beta-carotene among dairy cows with or without mastitis *Journal of Dairy Science*. 67: 1832–1840.
- KAEWLAMUN, W., OKOUYI, M., HUMBLLOT P., TECHAKUMPHU, M., PONTER, A. 2011. Does supplementing dairy cows with  $\beta$  -carotene during the dry period affect postpartum ovarian activity, progesterone, and cervical and uterine involution?. *Theriogenology*. 75: 1029–1038
- KAEWLAMUN, W., OKOUYI, M., HUMBLLOT, P., REMY, D., TECHAKUMPHU, M., DUVAUX-PONTER, C., PONTER, A. 2012. Effects of a dietary supplement of  $\beta$ -carotene given during the dry period on milk production and circulating hormones and metabolites in dairy cows. *Revue de Médecine Vétérinaire* 163 (5): 235-241.
- KALAČ, P. 2013. Carotenoids, ergosterol and tocopherols in fresh and preserved herbage and their transfer to bovine milk fat and adipose tissues: A review. *Journal of Agrobiology* 29(1):1–13.
- KING T., LOHMAN T., SMITH G. 1962. Evidence of rumeno-reticular losses of vitamin A and carotene. *Journal of Animal Science* 21:1002.

- KNIGHT T., RIDLAND M., HILL F., DEATH A., WYETH T. 1993. Effects of Stress and nutritional changes on the ranking of cattle on plasma Carotene concentrations. *New Zealand Society of Animal Production* 53:455-456.
- LARSON T., YANG A., TUME R. 1993. The in vitro destruction of rumen fluid carotenoids by plant lipoxygenases. *Biochemistry and Molecular Biology International*. 30:197-207.
- LINDQVIST, H. 2012.  $\alpha$ -Tocopherol and  $\beta$ -Carotene in Forages and their Utilisation by Dairy Cows in Organic Production. Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences
- MCDONALD P., EDWARDS R., GREENHALGH J., MORGAN C., SINCLAIR L., WILKINSON R. 2011. *Animal Nutrition*. 7<sup>ma</sup> edición Pearson Education Limited. England.
- MCDOWELL, L. 2000. *Vitamins in animal and human nutrition*. Ames: Iowa State University Press.
- MICHAEL, J., HEIRMAN, L., WONG, T., CHEW, B., FRIGG, M., VOLKER, L. 1994. Modulatory effects of dietary  $\beta$  Carotene on blood and mammary leukocyte function in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 77:1408-1421
- MONGE-ROJAS, R., CAMPOS H. 2013. Tabla de composición de alimentos de Costa Rica: Carotenoides y Tocoferoles. INCIENSA. Tres Ríos, Costa Rica.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 1982. *United States-Canadian tables of feed composition*. Tercera edición. National Academy Press, Washington DC.
- NOZIÈRE, P., GRAULET B., LUCAS A., MARTIN B., GROLIER P., DOREAU M. 2006. Carotenoids for ruminants: From forages to dairy products. *Animal Feed Science Technology* 131:418-450.
- OLIVEIRA, R., GUERREIRO, B., MORAIS JUNIOR, N., ARAUJO R., PEREIRA, R., PEREIRA M. 2015. Supplementation of prepartum dairy cow with  $\beta$  carotene. *Journal of Dairy Science* 98:6304-6314

- PUPPEL, K., NAŁĘCZ-TARWACKA, T., KUCZYŃSKA, B., GOŁĘBIEWSKI, M., KORDYASZ, M. 2013. Effect of different fat supplements on the antioxidant capacity of cow's milk. *Archiv Tierzucht* 56 (17), 178-190
- QUINTELA, L., DIAZ, C., BECERRA, J., ALONSO, G., GRACIA, S., HERRADÓN, P. 2008. Papel del  $\beta$  caroteno y la vitamina A en la reproducción en el ganado vacuno: revisión. *ITEA*. 104 (3): 399-410.
- RAKES, A., OWENS, P., BRITT, J., WHITLOW, L. 1985. Effects of adding betacarotene to rations of lactating cows consuming different forages. *Journal of Dairy Science*. 68:1732-1737
- VAN SOEST, P. J. (1982). *Nutritional ecology of the ruminant*. Cornell University Press. pp 260-263.
- WANG, D., GARCIA M., BISINOTTO R., MARTINEZ N., LIMA F., GRECO L., SHIN J., DICALACA A., RANIERI A., ARTIAGA B., GANDA E., GOMES G., BECKER L., SOARES S., REZENDE V., ENGSTROM M., SANTOS J., STAPLES, C. 2013. Effect of supplementing vitamin E and  $\beta$ -carotene to prepartum Holstein cattle on health and reproductive responses. *Journal of Dairy Science*. 96 (E-Suppl. 1):W76. (Abstr.).
- WEISS, W. 1998. Requirements of fat-soluble vitamins for dairy cow. *Journal of Dairy Science*. 81: 2493-2501
- YANG A., LARSEN T., TUME R. 1992. Carotenoid and retinol concentrations in serum, adipose tissue and liver and carotenoid transport in sheep, goats and cattle. *Australian Journal of Agricultural Research* 43:1089-1817.
- YANG A., MCLENNAN S., ARMSTRONG J., LARSEN T., SHAW F., TUMIC R. 1993. Effect of short-term grain feeding on bovine body-fat colour: a cautionary note. *Australian Journal of Agricultural Research* 44: 215-220.
- QUESADA R. 2007. Los Bosques de Costa Rica. IX Congreso Nacional de Ciencias. Instituto Tecnológico de Costa Rica Cartago, Costa Rica. Pp 1-16.

- AKORDOR F., STONE J., WALTON J., LESLIE K., BUCHANAN-SMITH J. 1986. Reproductive performance of lactating Holstein cows fed supplemental beta carotene. *Journal of Dairy Science* 69, 2173-2178.
- KEATING E., HALE W., HUBBERT F. 1964. In vitro degradation of vitamin A and carotene by rumen liquor. *5 Animal Science* 25:111-117.
- SEARLES, S., ARMSTRONG, J. 1970. Vitamin E, vitamin A, and carotene contents of alberta butter. *Journal of Dairy Science*. 53: 150-154.
- MONGE, J. 1979. Efecto del periodo abierto sobre la producción de leche. Tesis ingeniería Agrónoma. San José, Costa Rica, UCR, Facultad de Agronomía, 70pp.
- BENDICH, A., OLSON, J. 1989. Biological actions of carotenoids. *FASEB Journal* 3: 1927-1932.
- SHAW, D., FARIN, P., WASHBURN, S., BRITT, J. 1995. Effect of retinol plamitate on ovulation rate and embryo quality in superovulated cattle. *Theriogenology*. 44: 51-58.
- JUKOLA E., HAKKARAINEN J., SALONIEMI H., SANKARI S. 1996. Blood selenium, vitamin E, vitamin A, and  $\beta$ -carotene concentrations and udder health, fertility treatments, and fertility. *Journal of Dairy Science*. 79, 838-845.
- ROMERO, J. 1997. Retención de membranas fetales: caracterización y definición de factores de riesgo en hatos bovinos de lechería especializada en tres zonas de Costa Rica. Tesis Mag. Sc. Heredia, CR, UNA. 46p.
- IWAŃSKA, S., STRUSIŃSKA, D. 1997. The effect of beta-carotene and vitamins A, D3 and E on some reproductive parameters in cows. *Acta Vet. Hung.* 45, 95-107.
- QIAN, H., SHENG, M. 1999. Simultaneous determination of fat-soluble vitamins A, D and E and provitamin D2 in animal feeds by one-step extraction and high-performance liquid chromatography analysis. *Jornal of Chromatography A*. 825: 127-133.

- MORA, O., ROMANO, J., GONZALEZ, E., RUIZ, F., SHIMADA A. 1999. In vitro and in situ disappearance of D-carotene and lutein from lucerne (*Medicago saliva*) hay in bovine and caprine ruminal fluids. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 9:273—276
- JENSEN S., BJØRNBAK-JOHANNSEN K., HERMANSEN J. 1999. Quantitative secretion and maximal secretion capacity of retinol,  $\beta$ -carotene and  $\alpha$ -tocopherol into cows' milk. *Journal of Dairy Research*. 66:511-522.
- BERNABUCCI, U., RONCHI, B., LACETERA, N., NARDONE, A. 2005. Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 88: 2017–2026.
- AKAR, Y., GAZIOGLU, A. 2006. Relationship between vitamin A and  $\beta$  carotene levels during the postpartum period and fertility parameters in cows with and without retained placenta. *Bull Veterinary Institute Pullawy* 50: 93-96.
- ROSENDO, O. 2008. Desarrollo Sostenible de la Ganadería de Doble Propósito. Vitaminas. Uso racional en vacas Doble Propósito. 476-491
- DE ONDARZA, M., WILSON, J., ENGSTROM, M. 2009. Case study: Effect of supplemental  $\beta$ -carotene on yield of milk and milk components and on reproduction of dairy cows. *Prof. Anim. Sci.* 25:510–516.
- DE ORDANZA, M., ENGSTROM, M. 2009. Can beta-carotene help dairy reproduction?. *Feedstuffs*. 81(40): 1-5
- KAWASHIMA, C., KIDA, K., SCHWEIGERT, F., IYAMOTO, A. 2009. Relationship between plasma's  $\beta$ -carotene concentrations during the peripartum period and ovulation in the first follicular wave postpartum in dairy cows. *Animal Reproduction Science*. 111: 105–111.
- TROJAČANEC S., BOBOŠ S., PAJIĆ M. 2012. Influence of  $\beta$ -carotene and vitamin A supplementation on the ovarian activity of dairy cows with chronic fertility impairment. *VETERINARSKI ARHIV* 82 (6), 567-575.

VOGDANOU, S. 2014. Milk composition affected by feeding Jersey cows grass silage of different harvest times with or without rapeseed supplementation. MSc Thesis AARHUS Univeritet.

NOZIÈRE, P., GRAULET, B., LUCAS, A., MARTIN, B., GROLIER, P., DOREAU, M. 2006. Carotenoids for ruminants: From forages to dairy products. *Animal Feed Science and Technology* 11 (3-4), 418-450.