

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE CIENCIAS CLÍNICAS

**CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE RETINOL EN VAQUILLAS A
PASTOREO, EN PERÍODO DE INVIERNO Y PRIMAVERA, EN UN PREDIO DEL
SUR DE CHILE**

Memoria de título presentada como parte
de los requisitos para optar al TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO.

CAROLINA SOLEDAD GONZÁLEZ HERMOSILLA
VALDIVIA – CHILE

2005

PROFESOR PATROCINANTE

Pedro A. Contreras B.

PROFESOR COLABORADOR

Fernando Wittwer M.

PROFESORES CALIFICADORES

Frédéric Ahumada M.

Rubén Pulido F.

FECHA DE APROBACIÓN: 01 de diciembre de 2005

ÍNDICE

Capítulo	Página
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. MATERIAL Y MÉTODOS	11
5. RESULTADOS	13
6. DISCUSIÓN	15
7. BIBLIOGRAFÍA	18
8. ANEXOS	20
9. AGRADECIMIENTOS	22

*A mi familia por su amor y cariño durante
toda mi vida, especialmente a mi madre,
Aída, por hacer de mí la mujer que soy.*

1. RESUMEN

El retinol (vitamina A) se encuentra en el forraje como provitamina A (β -caroteno). En Chile no existen antecedentes sobre la concentración de β -caroteno en el forraje y no hay información de la concentración de retinol en plasma sanguíneo de bovinos a pastoreo, por ello el objetivo de este estudio fue medir las concentraciones plasmáticas de retinol en vaquillas a pastoreo en invierno y primavera y comparar ambos períodos.

Para el estudio se utilizaron 15 vaquillas Frisón negro, clínicamente sanas, entre 16 y 18 meses de edad, mantenidas a pastoreo sobre praderas naturales mejoradas. Mensualmente de cada animal se obtuvo muestras de sangre, desde julio hasta diciembre de 2004. Las concentraciones plasmáticas de retinol, se midieron utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa.

Los valores promedios de las concentraciones plasmáticas de retinol fueron de $0,46 \pm 0,09 \mu\text{g/ml}$ (rango de $0,26 - 0,64 \mu\text{g/ml}$). En invierno se observan los valores más bajos $0,42 \pm 0,09 \mu\text{g/ml}$ (rango $0,24$ a $0,60 \mu\text{g/ml}$) y en primavera los más altos $0,50 \pm 0,09 \mu\text{g/ml}$ (rango $0,32$ a $0,68 \mu\text{g/ml}$). Estos resultados fueron similares a los valores informados en la literatura.

Los valores promedio de concentraciones plasmáticas de retinol, obtenidos en este estudio, son los primeros datos presentes en Chile de concentración de retinol en plasma de vaquillas mantenidas a pastoreo.

Palabras claves: vaquillas, retinol, invierno-primavera.

2. SUMMARY

PLASMA RETINOL CONCENTRATION IN GRAZING HEIFERS DURING WINTER AND SPRING, IN A FARM IN THE PROVINCE OF VALDIVIA, CHILE

The forage contains provitamin A (β -carotene). In Chile there is no data about forage β -carotene concentration and there is no information about plasma retinol concentration in grazing heifers, for this reason the objective of this study is to measure the plasma retinol concentrations in grazing heifers, during the winter and spring and compare both periods.

In this study 15 clinically healthy Frisian heifers between 16 and 18 months of age were used. They were fed, grazing on fertilized natural prairies. From July to December of 2004, blood samples were taken monthly from each animal. The plasma retinol concentrations were determined using liquid chromatography of high performance on the phase reverse.

The average value of plasma retinol concentrations were from $0,46 \pm 0,09 \mu\text{g/ml}$ (range 0,26 – 0,64 $\mu\text{g/ml}$). The plasma retinol concentrations were lower in winter $0,42 \pm 0,09 \mu\text{g/ml}$ (range 0,24 to 0,60 $\mu\text{g/ml}$) and higher in spring $0,50 \pm 0,09 \mu\text{g/ml}$ (range 0,32 to 0,68 $\mu\text{g/ml}$). The average values of plasma retinol concentrations, obtained in this study, are the first datas available in Chile on plasma retinol in grazing heifers. The average values of plasma retinol concentrations are higher in spring than winter. These results were similar to other works founded in other publications.

Key words: heifers, retinol, winter-spring.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. ANTECEDENTES GENERALES

Las vitaminas son moléculas orgánicas de estructura compleja, esenciales en mínimas cantidades para la salud, crecimiento y reproducción de los rumiantes. Su deficiencia resulta en una diversidad de desórdenes metabólicos de gravedad variables (Ballet y col 2000). Las vitaminas pueden ser clasificadas de acuerdo a sus propiedades físicas y químicas según si, son solubles en soluciones acuosas, como las vitaminas del complejo B y vitamina C, o en solventes lipídicos, como las vitamina A, D, E y K (Rucker y Morris 1997).

Las vitaminas hidrosolubles sólo se almacenan en cantidad limitada y se requiere de consumo frecuente para conservar la saturación de los tejidos; las liposolubles pueden almacenarse en cantidades abundantes, lo que les confiere un potencial de toxicidad grave y mayor que las hidrosolubles (Marcus y Coulston 2001).

Los rumiantes difieren de los monogástricos con respecto a la necesidad exógena de vitaminas, ya que la síntesis del complejo B y la vitamina K ocurre durante la degradación y fermentación del alimento, por los microorganismos ruminales. La vitamina D es sintetizada a nivel de la piel por la acción de los rayos UV sobre esteroides presentes a este nivel y la vitamina C es sintetizada a partir azúcares (glucosa y galactosa), sin embargo, los rumiantes tienen dependencia específica de vitaminas A y E, por lo cual las requieren en su alimentación (Ballet y col 2000).

3.2. VITAMINA A (RETINOL)

El término vitamina A puede ser usado como descripción genérica para retinoides que manifiestan cualitativamente actividad biológica de retinol (IUNS, 1990). Químicamente la vitamina A es un anillo de β -ionona y una cadena lateral insaturada (Pond y col 2002), que contiene un grupo polar en su fin, cuya fórmula estructural es $C_{20}H_{29}OH$, presentada en la figura 1.

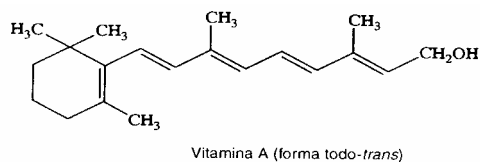


Figura 1. Forma todo-*trans* del retinol.

Hay diversos isómeros del retinol debido a las posibles configuraciones *cis-trans* alrededor de los dobles enlaces en la cadena lateral (Marcus y Coulston 2001), entre ellos tenemos el retinol, retinal, ácido retinoico y ésteres de retinil (Debier y Larondelle 2005), la actividad biológica de la forma *todo-trans* del retinol se considera que es del 100% (Pond y col 2002). Físicamente la vitamina A es una sustancia sólida, cristalina, de color amarillo claro, insoluble en agua, pero soluble en las grasas y los solventes de las grasas (McDonald y col 1999). Está presente como ésteres de lípidos en tejidos animales (Rucker y Morris 1997), en alimentos como: hígado, mantequilla, queso, leche entera, yema de huevo y pescado (Marcus y Coulston 2001). En plantas se encuentra en forma de provitamina A, estas provitaminas pertenecen a la familia de los carotenoides, por ejemplo β -caroteno, el cual se muestra en la figura 2 (Rucker y Morris 1997).

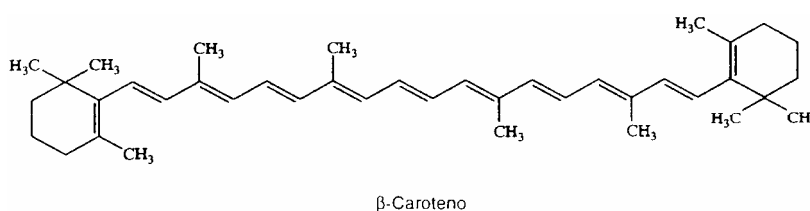


Figura 2. β -caroteno

El término carotenoides provitamina A, puede ser usado como descripción genérica para todos los carotenoides que manifiestan cualitativamente actividad biológica de β -caroteno (IUNS 1990). Más de 600 carotenoides han sido aislados, sin embargo, sólo aproximadamente 50 parecen tener algún grado de actividad de provitamina A (Rucker y Morris 1997). El enlace doble conjugado de los carotenoides origina un color amarillo característico (Pond y col 2002). De los carotenos; el β -caroteno, α -caroteno y la criptoxantina se convierten en vitamina A, no así la luteína ni el licopeno (Marcus y Coulston 2001). En las plantas, se encuentran en asociación con cloroplastos, formando complejos con proteínas y otros lípidos, que proveen la principal fuente de provitamina A para los animales (Rucker y Morris 1997). Los granos, con excepción del maíz amarillo, contienen cantidades insignificantes de caroteno, al igual que el heno de cereal (Radostits y col 2000).

3.3. METABOLISMO

La vitamina A de los forrajes proveniente de fuentes sintéticas o tejidos de animales está presente como éster de palmitato, éste al igual que los triacilglicéridos, es hidrolizado por enzimas pancreáticas activadas por sales biliares, luego es incorporado a micelas lipídicas y a través de transporte activo es absorbido en la microvellosidades de la porción anterior del yeyuno, uniéndose a una proteína celular de unión a retinol (CRBP II), luego se reesterifica a palmitato y se incorpora a quilomicrones y así es transportado por la linfa, para almacenarse en

el hígado como éster de retinil (Pond y col 2002, Marcus y Coulston 2001, Debier y Larondelle 2005). Los rumiantes consumen el forraje y de esta forma los carotenos llegan al rumen, donde se produce la liberación de éstos desde la planta y además una alta degradación de vitaminas por parte del rumen, en esta etapa se indican pérdidas promedio de β -caroteno del 20% (Ballet y col 2000). Los carotenoides se transforman en retinal en el intestino delgado por acción de la enzima 15,15'-dioxigenasa, parte de este retinal se oxida hacia ácido retinoico y la otra se reduce a retinol que es reesterificado e incorporado a quilomicras como se describió anteriormente (Marcus y Coulston 2001), sin embargo pueden absorberse cantidades de β -caroteno sin antes convertirse en vitamina A, estos pigmentos son los responsables del color amarillo del plasma bovino (Ruckers y Morris 1997). La eficiencia de conversión del β -caroteno es variable, depende de la raza y del contenido de éste en la dieta, en general 6 μ g de β -caroteno producen 1 μ g de retinol (Herdt y Stowe 1991, McDonald y col 1999). Según Ballet y col (2000) la conversión del β -caroteno también varía de acuerdo al estado de salud del animal y a la cantidad consumida, 1 mg de β -caroteno es igual a 400 UI de vitamina A en vacas de lechería.

Cuando el organismo necesita vitamina A, los ésteres de retinol en el hígado son hidrolizados y liberados como retinol unido a una proteína específica, “proteína de unión a retinol” (RBP), que fija una molécula de retinol por molécula de proteína. Esta unión circula en la sangre en un complejo con transtirretina, una prealbúmina de unión a tiroxina, la cual estabiliza a la RBP, este complejo protege al retinol de la oxidación y destrucción durante el transporte hacia sus células target (Rucker y Morris 1997, Marcus y Coulston 2001, Debier y Larondelle 2001). En la retina el retinol se convierte en 11-cis-retinal, que se incorpora a la rodopsina, en otros tejidos se oxida a ácido retinoico, que es transportado hacia receptores en el núcleo de las células, en un complejo con la proteína de unión a ácido retinoico CRABP (Marcus y Coulston 2001, Debier y Larondelle 2001).

La oxidación de los retinoides en el hígado ocurre por dos vías, la principal involucra una isoenzima, alcohol deshidrogenasa, la segunda involucra a oxidasas microsomales, algunos productos de la oxidación son suficientemente polares para ser excretados por la orina, sin embargo la mayor ruta de eliminación es la bilis (Rucker y Morris 1997).

Por otra parte el retinol se transfiere desde la madre por el calostro y leche en forma de ésteres de retinil (Debier y Larondelle 2001).

Hay factores que afectan las concentraciones plasmáticas y hepáticas de vitamina A, tales como: los nitratos presentes en el rumen, que se reducen a nitritos y aumentan la degradación de vitamina A por reducción de los dobles enlaces en la molécula de retinol, esta destrucción depende de pH, es más rápida con valores menores a 5 (Herdt y Stowe 1991) Por otra parte patologías como: la deficiencia de proteína, deficiencia de Zn (Pond y col 2002); enfermedades hepáticas, insuficiencia pancreática, las fallas renales que pueden provocar pérdida de RBP en la orina, factores que influyen en la absorción y transporte de los lípidos (Rucker y Morris 1997). Naftalenos altamente clorados y la deficiencia de fósforo dificultan la conversión de caroteno a retinol o bien pueden reducir los índices de conversión. El ingreso de fosfato inorgánico afecta el almacenamiento de la vitamina A (Radostits y col 2000).

3.3.1 Unidades y concentraciones tisulares

La actividad biológica de la vitamina A se expresa en unidades internacionales, una UI de vitamina A es la actividad biológica específica de 0,3 µg de retinol o 0,6 µg de β-caroteno (Marcus y Coulston 2001). La vitamina A se expresa además en equivalentes de retinol, un equivalente de retinol es igual 0,167 µg de β-caroteno (Pond y col 2002).

Las concentraciones plasmáticas de vitamina A son frecuentemente expresadas como la suma de retinol y retinil palmitato. Sin embargo por técnicas cromatográficas pueden ser separadas y aportan mayor información clínica (Herdt y Stowe 1991). La cromatografía líquida de alto rendimiento es una técnica de separación de moléculas en función de su tamaño y su forma, presenta una alta eficacia en separación y selectividad de la molécula que se quiere cuantificar, lo que hace que presente una alta sensibilidad analítica (González de Buitrago 1998), esta técnica es la utilizada en el presente trabajo.

Las concentraciones séricas de retinol en bóvinos son de 0,44 a 0,64 µg/ml, estos datos corresponden a los meses de invierno y primavera (Cetinkaya y Özcan 1991). Las concentraciones del caroteno en el plasma varían ampliamente en relación a la dieta, considerándose valores plasmáticos óptimos de 1,5 µg/ml. Las concentraciones de caroteno y vitamina A en el hígado son de 60 y 4 µg/g de tejido hepático respectivamente.

No existe una relación obligada entre los valores plasmáticos y hepáticos de caroteno y de vitamina A, ya que los primeros comienzan a disminuir cuando hay agotamiento de las reservas en el hígado (Radostits y col 2000).

3.4. FUNCIONES

Las funciones de la vitamina A están mediadas por diferentes formas de la molécula, en la visión, la forma funcional es el retinal y en el resto del organismo es el ácido retinoico.

En el ojo: la síntesis de rodopsina ocurre cuando el 11-*cis*-retinol (isómero de retinol) se convierte en 11-*cis*-retinal y se combina con opsina (proteína); el ciclo visual se inicia con la absorción de un fotón de luz en los bastones, seguida de fotodescomposición de rodopsina mediante una cascada de estados de conformación inestable, que conduce a la isomerización del 11-*cis* retinal y liberación de la mitad de la opsina, generándose un impulso nervioso que viaja al cerebro a través del nervio óptico, produciéndose posteriormente la repetición del ciclo.

En el tejido epitelial: posee funciones relacionadas con la integridad estructural y funcional de las células, además de la diferenciación, transformación y crecimiento de las mismas en todo el organismo (Marcus y Coulston 2001, Debier y Larondelle 2005). Dentro de la célula, el todo-*trans* retinol puede ser oxidado e isomerizado a 13-*cis* ácido retinoico, el cual se une a una proteína de unión específica para ácido retinoico en el citosol CRABP I y II,

formando un complejo que actúa como factor de transcripción en la regulación y diferenciación celular (Rucker y Morris 1997).

En el hueso, líquido cefalorraquídeo y feto: el retinol es necesario para conservar la actividad posicional normal de los osteoblastos y osteoclastos, para mantener la presión normal del líquido cefalorraquídeo, además cumple funciones en la formación de órganos durante el crecimiento del feto (Debier y Larondelle 2005, Radostits y col 2000).

En la función inmunitaria: El retinol y β -caroteno mantienen las células de los órganos linfoides, mejoran la inmunidad celular y humoral (Chew 1987). Los carotenoides participan mejorando la blastogénesis de linfocitos, incrementando la población de linfocitos específicos, la actividad de linfocitos citotóxicos y estimulando la producción de varias citocinas (Chew 1993). El incremento de las concentraciones séricas de retinol se asoció con una disminución en un 60% de riesgo de contraer mastitis clínica postparto (LeBlanc y col 2004).

Los carotenoides además de metabolizarse hacia retinoides, actúan como antioxidantes de fase lipídica (Marcus y Coulston 2001).

3.5. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE DEFICIENCIA DE RETINOL

La deficiencia de vitamina A ocurre como enfermedad primaria, provocada por una deficiencia absoluta de la vitamina o de su precursor, o bien secundaria, por obstaculizaciones a nivel del metabolismo de éstos mismos.

Los signos clínicos pueden esperarse con concentraciones séricas de vitamina A por debajo de los 0,05 $\mu\text{g/ml}$. Por otra parte aparecen signos de deficiencia alrededor de los 0,09 $\mu\text{g/ml}$ de concentraciones de caroteno sérico. En tanto que en hígado los valores en que se observan signos clínicos son de 0,5 y 2 $\mu\text{g/g}$ de tejido hepático para la vitamina A y caroteno respectivamente (Radostits y col 2000).

En animales estabulados que reciben raciones ricas en cereales, se han observado signos graves de deficiencia, en ellos se recomienda incluir un aporte vitamínico en la dieta, en cambio en los animales adultos mantenidos a pastoreo, es poco probable que se presenten signos graves de enfermedad, salvo que la carencia se prolongue, esto se debe al consumo de provitaminas, que se acumulan como reservas en el hígado.

Los signos más frecuentes de deficiencia en animales son los siguientes:

3.5.1. Visión

En todos los animales uno de los primeros signos de deficiencia es la menor visión en la oscuridad, lo que se denomina hemeralopia o ceguera nocturna (McDonald y col 1999).

Además de xeroftalmia con engrosamiento y turbiedad de la córnea, que ocurre sólo en los terneros (Radostits y col 2000).

3.5.2. Tejido epitelial

En ausencia de retinol, las células mucosas caliciformes desaparecen y se observa, sobre-queratinización de las células epiteliales, esto determina la pérdida de funciones, disminuyendo la secreción mucosa, lo que predispone a infecciones pulmonares y de otros tejidos que dependen de la barrera mucosa; en el intestino la queratinización prematura de los enterocitos origina mala absorción (Ruckers y Morris 1997).

La función reproductiva también se afectada, en machos se produce degeneración del epitelio germinativo de los túbulos seminíferos, en hembras pueden producirse abortos o expulsión de fetos muertos o débiles. Es frecuente la retención placentaria (Radostits y col 2000).

En tiroides la deficiencia de la vitamina A reduce la secreción de tiroxina y ocasiona hiperplasia de las células (Pond y col 2002).

En piel pueden ocurrir grandes depósitos de escamas cutáneas.

3.5.3. Líquido cefalorraquídeo, hueso y feto

Se observa un aumento de la presión del líquido cefalorraquídeo, debido a una alteración de la absorción de éste, provocada por el descenso de la permeabilidad tisular de las vellosidades aracnoideas y engrosamiento de la matriz del tejido conectivo de la duramadre cerebral. En el sistema nervioso los daños incluyen parálisis, es probable encontrar lesiones en las raíces nerviosas periféricas, encefalopatía a consecuencia del aumento de presión intracraneal y ceguera por constricción del nervio óptico.

En el tejido óseo puede ocurrir una incoordinación del desarrollo óseo. Se producen también defectos congénitos, que en terneros están limitados a ceguera debido a constricción del nervio óptico y encefalopatías.

3.5.4. Inmunidad

Se produce una disminución de la inmunidad tanto celular como humoral, por lo tanto aumenta el riesgo a enfermedades (Radostits y col 2000).

3.6. REQUERIMIENTOS

Para cualquier animal los requerimientos de retinol dependen de la edad, sexo, tasa de crecimiento y estatus reproductivo (Ruckers y Morris 1997).

Según ARC (1980) los requerimientos para mantención y crecimiento, de retinol son de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vivo diariamente. Cantidades de 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vivo al día, son necesarios para los estados de concepción y preñez, para vacas en lactancia los requerimientos de retinol son de 25 a 65 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vivo al día.

NRC (2001) en tanto presenta requerimientos de vitamina A para animales de lechería en crecimiento de 24 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vivo al día y para ganado adulto 33 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vivo al día, categoría que incluye a vacas adultas, vacas en lactancia y vacas secas.

3.7. DISPONIBILIDAD DE β -CAROTENO EN EL FORRAJE

El forraje como fuente de alimentación juega un rol significativo en el suministro de vitaminas para los rumiantes, sin embargo, la concentración de vitaminas contenidos en ellos es altamente variable y depende de factores que incluyen el tipo de planta, estado de madurez, condiciones climáticas, métodos de conservación y condiciones de almacenamiento. En nuestro país no se encuentra información que indique las cantidades de carotenos aportados por la pradera o por los forrajes conservados.

Entre los factores involucrados en la variación de las concentraciones de β -caroteno en la pradera, está: el tipo de la planta, ya que durante el crecimiento en estados tempranos, las gramíneas y las leguminosas presentan similares concentraciones de β -caroteno, aproximadamente 300 $\text{mg}/\text{kg}/\text{MS}$ promedio, sin embargo en estado de floración y maduración, las leguminosas son más ricas en β -caroteno que las gramíneas, esto es debido a que la proporción de tallos en leguminosas es menor que en las gramíneas. Las concentraciones máximas de β -caroteno ocurren al comienzo de la floración y luego disminuyen con variados grados de intensidad, esto se debe al cambio en la relación tallo-hoja a través del curso de la maduración.

En relación a las condiciones climáticas, se puede apreciar que el forraje es más rico en β -caroteno cuando hay mayor humedad; el calor y la luz intensa, baja la producción de caroteno de las hojas.

Otros factores que influyen en el contenido de vitaminas en el forraje son los métodos de conservación y las condiciones de almacenamiento. Según la literatura pueden indicarse valores de 15 a 606 $\text{mg}/\text{kg}/\text{MS}$, con una media de 196 $\text{mg}/\text{kg}/\text{MS}$ de β -caroteno, para los forrajes verdes. El heno y ensilaje presentan pérdidas de β -caroteno del orden de 80% y 30% respectivamente (Ballet y col 2000).

Los animales mantenidos a pastoreo generalmente pueden obtener un aporte adecuado de retinol, sin embargo durante sequías prolongadas, animales a pastoreo con escasez de alimento y aquellos que están confinados, alimentados con raciones preparadas y conservadas, pueden presentar deficiencias graves de vitamina A (McDonald y col 1999).

Por los antecedentes expuestos se formula la siguiente hipótesis: vaquillas a pastoreo en praderas naturalizadas, durante el período de invierno y primavera, presentan concentraciones de retinol en el plasma sanguíneo, dentro de los rangos fisiológicos señalados por la literatura.

Para aprobar o rechazar la hipótesis se realiza el presente estudio, que tiene los siguientes objetivos:

3.7.1. Objetivo General

Medir las concentraciones plasmáticas de retinol, en vaquillas a pastoreo durante el período de invierno y primavera, en un predio del sur de Chile y comparalos con los rangos fisiológicos señalados por la literatura.

3.7.2. Los objetivos específicos

3.7.2.1. Medir las concentraciones de retinol en el plasma sanguíneo de vaquillas a pastoreo en invierno.

3.7.2.2. Medir las concentraciones de retinol en el plasma sanguíneo de vaquillas a pastoreo en primavera.

3.7.2.3. Comparar las concentraciones de retinol en el plasma sanguíneo de vaquillas a pastoreo en invierno y en primavera.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 ANIMALES EXPERIMENTALES

Los animales experimentales utilizados fueron 15 vaquillas Frisón negro, clínicamente sanas, entre 14 y 18 meses de edad en julio de 2004, con un peso aproximado de 253 ± 40 kg, (rango 173 – 333 kg) pertenecientes al Fundo Punahue, ubicado en la provincia de Valdivia; 39° latitud sur, 73° latitud oeste, propiedad de la Universidad Austral de Chile. Los animales estaban identificados con un arete metálico del predio y otro plástico asignado para el estudio.

Las vaquillas durante el período de invierno y primavera, fueron mantenidas a pastoreo, en praderas naturales mejoradas, en las cuales predomina pasto ovilla (*Dactylis glomerata*), pasto dulce (*Holcus lanatus*), ballica (*Lolium sp.*) y trébol blanco (*Trifolium sp.*). En los períodos de escasez se les suministró ensilaje, hecho con forraje del mismo tipo de pasturas.

4.2 OBTENCIÓN Y MANEJO DE LAS MUESTRAS

Las muestras de sangre en el período invernal, se obtuvieron mensualmente en 3 oportunidades: 21 de julio, 18 de agosto, 16 de septiembre. En el período primaveral las muestras fueron obtenidas igualmente de forma mensual en 3 oportunidades: 21 de octubre, 18 de noviembre y 2 de diciembre del 2004, totalizando 6 períodos de muestras.

De cada una de las 15 vaquillas se obtuvo en cada oportunidad 10 ml de sangre con heparina, mediante venopunción yugular. Las muestras fueron centrifugadas a 1500 g durante 10 minutos, para obtener el plasma, el cual se guardó en microtubos plásticos de 1,5 ml y se almacenó a -25°C , hasta su análisis.

4.3 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Para estimar la concentración de retinol se utilizó la técnica de Paulo y col (1999), en la cual se determina la vitamina a través de cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa, usando 100% metanol como fase móvil, a una tasa de flujo de 1,5 ml/minuto y con longitud de onda de 300 nm; los estándares fueron preparados con cloroformo y diluidos en metanol. Esta técnica en el presente estudio se realizó con algunas modificaciones, las que se especifican en la descripción del procedimiento.

En el Laboratorio de Patología Clínica Veterinaria, se realizó la fase de extracción del retinol (vitamina A) desde el plasma sanguíneo. Para ello se tomó 1 ml de plasma en un tubo de ensayo de vidrio, se le adicionó 100 μ l de un estándar interno (acetato de retinol 15 μ g/ml), posteriormente se adicionó 2 ml de etanol, luego se adicionó 3 ml de ciclohexano con hidroxitolueno butilado (BHT) al 0,001%, agitándose la muestra entre cada adición 10, 20 y 45 segundos respectivamente. Posteriormente se centrifugó a 2000 g por 10 minutos a 4°C. Luego se extrajo desde el sobrenadante el ciclohexano, el cual se pasó por un filtro de membrana inorgánico hacia un tubo de ensayo de vidrio. Este tubo fue colocado en un baño maría a 40°C, el ciclohexano fue evaporado a sequedad bajo corriente de nitrógeno. Finalmente la muestra fue reconstituída con 100 μ l de una solución de éter-etanol 1:9 v/v, agitándose para resuspender todo el material adherido a la pared del tubo.

De esta forma la muestra estuvo en condiciones para ser llevada al Laboratorio de Farmacología, en donde se realizó la determinación de la concentración de retinol de las muestras. Esto fue hecho mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) en fase reversa, utilizando una columna Kromasil C18, 150 x 4.6 mm x 5 μ m, en un cromatógrafo de HPLC Perkin-Elmer, acoplado a un detector de rayos UV. En el equipo de HPLC se utilizaron en la fase móvil, sistema de solventes consistente en 100% metanol a un flujo de 1,5 ml/minuto, con una longitud de onda de 325 nm y se inyectaron 20 μ l de la muestra al equipo para su lectura.

La identificación del retinol y del acetato de retinol se realizó mediante comparación de los tiempos de retención con sus respectivos estándares, los cuales fueron preparados en base a etanol con concentraciones de 1,0; 2,5; 5,0 y 10,0 μ g/ml. El cálculo de la concentración de retinol se realizó por interpolación del valor obtenido de cada muestra, previamente ajustado al porcentaje de recuperación del estándar interno, sobre una curva de calibración que establece el programa del HPLC. La concentración de retinol se expresa en μ g/ml de plasma.

4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se expresan en promedios y desviaciones estándar para cada período de muestreo, durante el invierno y primavera.

Posterior a la evaluación de la homocedasticidad y distribución de los datos, a través del test de Bartlett's y Shapiro Wilks, se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) de muestras repetidas, para establecer la significancia de las diferencias y luego para identificarlas se realizó el test de comparaciones múltiples de Tuckey. En el procesamiento de los datos se empleó el programa Graphpad Prism versión 3.0 complementado con una planilla Excel, usándose un valor de significancia de $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

El promedio de las concentraciones plasmáticas de retinol de los 3 muestreos hechos en el período invernal y los 3 del período primaveral se presentan en el cuadro 1. Los promedios de las concentraciones plasmáticas de retinol, según fecha de muestreo, se encuentran en el anexo 1 y los datos obtenidos de cada animal, en cada muestreo, se encuentran en el anexo 2.

Cuadro 1. Promedios (\pm DE) de concentraciones plasmáticas de retinol ($\mu\text{g/ml}$) en 15 vaquillas a pastoreo en períodos de invierno y primavera.

Periodo	Concentración plasmática de retinol ($\mu\text{g/ml}$)	
	$\bar{x} \pm \text{DE}$	Rango
Invierno*	$0,42 \pm 0,09^a$	0,24 0,60
Primavera**	$0,50 \pm 0,09^b$	0,32 0,68
\bar{x} Total	$0,46 \pm 0,09$	0,28 0,64

Letras diferentes indican $P < 0,05$. *Muestras obtenidas en julio, agosto y septiembre.

** Muestras obtenidas en octubre, noviembre y diciembre.

La concentración promedio más baja de retinol ($0,41 \pm 0,08 \mu\text{g/ml}$) se observó en el mes de julio, correspondiente al inicio del invierno, posteriormente comenzó a aumentar hasta el mes de Octubre ($0,53 \pm 0,10 \mu\text{g/ml}$), permaneciendo relativamente estable hasta el final del período de estudio en primavera.

En los meses invernales las concentraciones plasmáticas promedio de retinol, son similares entre sí, lo mismo ocurre entre los meses de primavera, pero, como períodos estacionales, el promedio de primavera es significativamente mayor que el de invierno ($P < 0,01$).

En el período de invierno y primavera se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) de las concentraciones plasmáticas de retinol, entre los meses de muestreo, éstas se presentan en la figura 3.

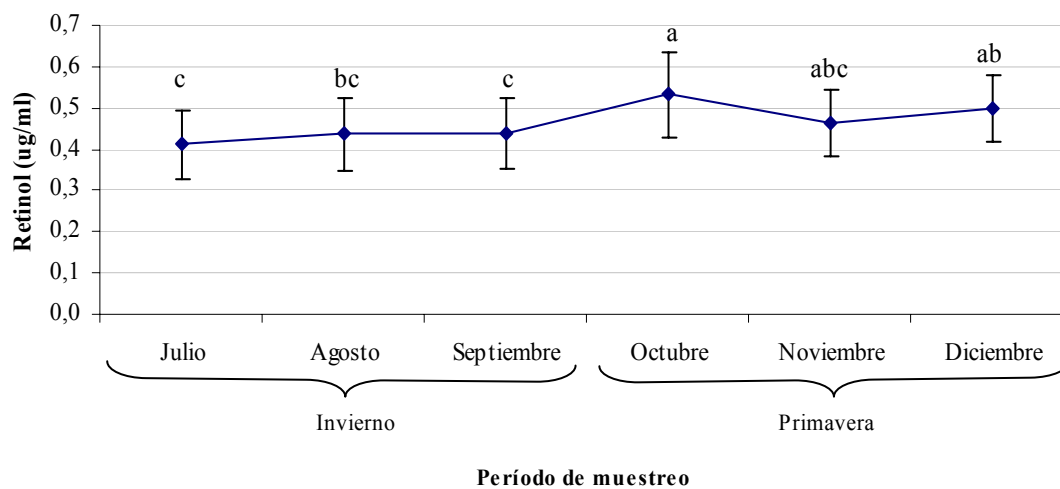


Figura 3. Variaciones de las concentraciones plasmáticas promedios (\pm DE) de retinol, en 15 vaquillas a pastoreo en los meses de invierno y primavera. Las letras diferentes indican $P < 0,05$.

6. DISCUSIÓN

6.1 CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE RETINOL

En las 15 vaquillas mantenidas a pastoreo, el promedio de las concentraciones plasmáticas de retinol obtenido en el período de estudio fue de $0,46 \pm 0,09$ $\mu\text{g/ml}$ y el rango para referencia que se obtiene de este promedio ± 2 DE es de 0,26 a 0,64 $\mu\text{g/ml}$, estos valores son similares a los valores informados por Cetinkaya y Özcan (1991).

Una de las razones a la cual puede ser atribuida la diferencia en las concentraciones plasmáticas de retinol, es la edad del animal, ya que en este estudio se trabajó con vaquillas, las que tienen menores requerimientos que vacas adultas. También puede influir la metodología utilizada para realizar la medición.

Cetinkaya y Özcan (1991) utilizaron como técnica analítica HPLC, evaluando vacas Holstein y cruza de Brown swiss, de 3,5 y 4 años en promedio de edad en cada grupo, con diferente tipo de alimentación. En ambos grupos el retinol aumentó significativamente en primavera y verano donde la disponibilidad de forrajes verdes y fresco aumenta. Los valores que obtuvieron de concentraciones séricas promedio de retinol para invierno y primavera presentan un rango entre 0,44 a 0,64 $\mu\text{g/ml}$; similares a las presentadas en este estudio.

Tekpetey y col (1987) midieron vitamina A por espectrofotometría y establecieron valores promedio de $0,31 \pm 0,09$ a $0,40 \pm 0,08$ $\mu\text{g/ml}$, concentraciones más bajas que las obtenidas en el presente trabajo. Tekpetey y col (1987) realizaron su estudio en vacas Holstein mantenidas en invierno con heno y ensilajes y en verano se mantuvieron a pastoreo. Sin embargo el estudio no informa si los valores son sólo de retinol o de la suma de retinol + retinil ésteres.

Katamoto y col (2003) por su parte, analizaron muestras de suero sanguíneo mediante HPLC, en vacas de 2 a 17 años de edad, las cuales fueron mantenidas en confinamiento con heno y suplementadas con concentrados comerciales. Lo que difiere de las condiciones de pastoreo permanente en que se mantuvieron las vaquillas utilizadas en este estudio. La concentración sérica promedio de retinol obtenida fue de $0,21 \pm 0,01$ $\mu\text{g/ml}$ (rango 0,10 – 0,45 $\mu\text{g/ml}$), estos resultados son menores que los presentados en este trabajo.

6.2 VARIACIONES ESTACIONALES DE RETINOL EN PLASMA

Es importante considerar el clima que posee el lugar donde fueron realizados los estudios citados en este trabajo. Así tenemos que en Chile, en la región donde se realizó este estudio, posee un clima de tipo oceánico con influencias mediterráneas, a diferencia del clima mediterráneo que posee la ciudad de Ancara, Turquía, lugar donde se realizó el estudio de Cetinkaya y Özcan (1991) quienes, en el período de un año, observaron las variaciones estacionales de los promedios de concentraciones plasmáticas retinol. Por otra parte en Winnipeg, Manitoba en Canadá, con un clima de tipo continental, también se estudió en el transcurso de un año variaciones estacionales del retinol por Tekpetey y col (1987). En tanto que Katamoto y col (2003) trabajaron en Hyogo, Japón, determinando concentraciones de retinol, en un tipo de clima denominado chino. Esto define el crecimiento del forraje en los distintos lugares, lo que determina la disponibilidad de β -caroteno.

Los resultados de este estudio señalan que en el período primaveral, hay mayor concentración de retinol en el plasma sanguíneo de las vaquillas ($0,50 \pm 0,09 \mu\text{g/ml}$) que en período invernal ($0,42 \pm 0,09 \mu\text{g/ml}$), además, estos promedios fueron en aumento hasta quedar relativamente estables mientras se acercaba el verano. El hecho de que en primavera hubiera mayor concentración plasmática de retinol que en el invierno, concuerda con los trabajos de Cetinkaya y Özcan (1991) y Tekpetey y col (1987). Ambos estudios obtuvieron resultados de valores más altos en el último mes de primavera a inicios del verano. En el presente trabajo el valor promedio más alto se obtuvo a principio de primavera. Esto podría explicarse por una mayor concentración de β -caroteno en la pradera a medida que se acerca la primavera- verano.

También se debe considerar la capacidad de almacenamiento del retinol en el hígado, ya que las concentraciones plasmáticas de retinol pudieron mantenerse estables, probablemente porque las vaquillas estudiadas tenían un suficiente almacenamiento de retinol en el hígado, que utilizarían en los períodos en que el forraje no les aporta la cantidad de carotenos necesaria para la conversión a retinol en el organismo.

Las diferencias observadas en los datos informados por la literatura se deben a diversos factores, tales como: diferencia etaria, condiciones fisiológicas y alimentarias. Se ha informado en otros estudios que las concentraciones más altas de vitamina A en el plasma, ocurren durante el proestro y el estro (Haliloglu y col 2002). Ninguno de los informes de valores de concentraciones plasmáticas de retinol en bovinos, disponibles, fue hecho en animales hembras de 14 a 18 meses de edad, por lo que la comparación con éstos es imprecisa. Según Block y Farmer (1987) la edad del animal tiene un efecto negativo sobre la concentración plasmática de vitamina A, esto indica que los terneros y las vaquillas comparadas con vacas adultas, tienen mayor concentración de vitamina A en el plasma sanguíneo, señalando que las vaquillas tendrían mayor almacenamiento de la vitamina en el hígado, para su primera lactancia, o bien porque absorben más eficientemente la vitamina A que las vacas.

Los promedios de concentraciones de retinol obtenidos, sugieren que las reservas de β -caroteno en las vaquillas analizadas, son suficientes para mantener las concentraciones plasmáticas de retinol. Sin embargo es muy difícil que a partir de las concentraciones plasmáticas de retinol se puedan estimar las concentraciones plasmáticas de β -caroteno, ya que existen estudios que muestran una tasa conversión de β -caroteno a retinol deprimida cuando la dieta es alta en β -caroteno (Cetinkaya y Özcan 1991).

Son necesarios otros estudios para evaluar la significancia biológica de las concentraciones plasmáticas de retinol, en vaquillas mantenidas a pastoreo. De tal forma, que sea posible definir si los resultados obtenidos, son los adecuados para la especie, raza, sexo y edad. Además de las condiciones de alimentación. Para ello sería necesario hacer mediciones en animales alimentados con otro tipo de dieta, o bien suplementados con retinol y evaluar posteriormente la respuesta a estas condiciones.

Además sería conveniente realizar estudios en bovinos de otras edades y condiciones fisiológicas los cuales no presentan los mismos requerimientos de vitamina A y β -caroteno, que las vaquillas analizadas en este estudio.

6.3 CONCLUSIONES

El promedio de las concentraciones plasmáticas de retinol de 15 vaquillas mantenidas a pastoreo, en invierno y primavera fue de $0,46 \pm 0,09 \mu\text{g/ml}$, con rango de 0,28 a 0,64 $\mu\text{g/ml}$.

Estos valores son similares a los valores informados por la literatura para el bovino.

Los promedios de concentraciones plasmáticas de retinol fueron mayores en primavera que en el invierno.

7. BIBLIOGRAFÍA

ARC (Agricultural Research Council). 1980. *The nutrient requirements of ruminant livestock*. Commonwealth Agricultural Bureaux. London, England.

Ballet N, Robert JC, Williams PEV. 2000. Vitamins in Forages. En: Givens DI, Owen E, Axford RFE, Omed HM (eds). *Forage evaluation in ruminant nutrition*. Pp. 399-431. CABI Publishing, Wallingford, U.K., New York, USA.

Block E, Farmer B. 1987. The status of beta-carotene and vitamin A in Quebec dairy herds: factors affecting their status in cows and their effects on reproductive performance. *Can J Anim Sci* 67, 775-778.

Cetinkaya N, Özcan H. 1991. Investigation of seasonal variations in cow serum retinol and β -carotene by high performance liquid chromatographic method. *Comp Biochem Physiol* 100A, 1003-1008.

Chew BP. 1987. Vitamin A and β -carotene on Host Defense. *J Dairy Sci* 70, 2732-2743.

Chew BP. 1993. Role of carotenoids in the immune response. *J Dairy Sci* 76, 2804-2811.

Debier C, Larondelle Y. 2005. Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring. *Brit J Nutr* 93, 153-174.

González de Buitrago JM. 1998. Osmometría. Cromatografía. Electroforesis. Técnicas electroquímicas. En González de Buitrago JM, Arilla E, Rodríguez-Sesage S, Sánchez A (eds). *Bioquímica clínica*. Pp. 17-27. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España.

Haliloglu S, Baspinar N, Serpek B, Erdem H, Bulut Z. 2002. Vitamin A and β -Carotene levels in plasma, corpus luteum and follicular fluid of cyclic and pregnant cattle. *Reprd Dom Anim* 37, 96-99.

Herdt TH, Stowe HD. 1991. Fat-soluble vitamin nutrition for dairy cattle. *Vet Clin North Am: Food Anim Pract* 7, 391-415.

International Union of Nutritional Science. 1990. Nomenclature Policy: Generic descriptors and trivial names for vitamins and related compounds. *J Nutr* 120, 12-19.

Katamoto H, Yamada Y, Nishizaki S, Hashimoto T. 2003. Seasonal changes in serum vitamin A, vitamin E and β -Carotene concentrations in Japanese Black Breeding cattle in Hyogo prefecture. *J Vet Med Sci* 62, 1001-1002.

LeBlanc SJ, Herdt TH, Seymour WM, Duffield TF, Leslie KE. 2004. Peripartum serum vitamin E, retinol, and beta-carotene in dairy cattle and their associations with disease. *J Dairy Sci* 87, 609-619.

Marcus R, Coulston AM. 2001. Vitaminas Liposolubles. En: Hardman JG, Limbird LE, Goodman Gilman A (eds). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Pp. 1793-1803. 10ma ed., McGraw-Hill Interamericana. Ciudad de México, México.

McDonald P, Edwards RA, Greenhalgh JFD, Morgan CA. 1999. *Nutrición animal*. 5ta ed., editorial Acirbia. Zaragoza, España.

NRC (National Research Council). 2001. Nutrient requirement of dairy cattle. National Academic Press. Washington, U.S.A.

Paulo MG, Cabral HM, Morais JAG, Almeida AJ. 1999. An isocratic LC method for the simultaneous determination of vitamins A, C, E and β -carotene. *J Pharm Biomed Anal* 21, 399-406.

Pond WG, Church DC, Pond KR. 2002. *Fundamentos de nutrición y alimentación de animales*. 2da ed., editorial Limusa. Ciudad de México, México.

Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff, KW. 2000. *Veterinary Medicine*. W.B, Saunders Company Ltd, London, UK.

Rucker RB, Morris JG. 1997. The vitamins. En: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML (eds). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Pp 703-711. 5ta ed., Academic Press. San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto.

Tekpetey FR, Palmer WM, Ingalls JR. 1987. Seasonal variation in serum β -carotene and vitamin A and their association with postpartum reproductive performance of Holstein cows. *Can J Anim Sci* 67, 491-500.

ANEXO 1

Promedios (\pm DE) de concentraciones plasmáticas de retinol ($\mu\text{g/ml}$) en vaquillas a pastoreo en los meses de invierno y primavera.

Periodo	Mes	Concentración plasmática de retinol ($\mu\text{g/ml}$)	
		$\bar{x} \pm \text{DE}$	Rango
Invierno	Julio	0,41 \pm 0,08	0,25 0,57
	Agosto	0,44 \pm 0,09	0,26 0,62
	Septiembre	0,44 \pm 0,09	0,26 0,62
Total invierno		0,42 \pm 0,09 ^a	0,24 0,60
Primavera	Octubre	0,53 \pm 0,10	0,33 0,73
	Noviembre	0,46 \pm 0,08	0,30 0,62
	Diciembre	0,50 \pm 0,08	0,34 0,66
Total primavera		0,50 \pm 0,09 ^b	0,32 0,68
\bar{x} Total		0,46 \pm 0,09	0,28 0,64

Letras diferentes en la columna indican $P < 0,05$

ANEXO 2

Concentraciones plasmáticas de retinol obtenidas de 15 vaquillas mantenidas a pastoreo durante los meses de invierno y primavera. Expresada en $\mu\text{g/ml}$.

N° de identificación del animal	Fechas de Muestreo					
	21 Julio	18 Agosto	16 Septiembre	21 Octubre	18 Noviembre	2 Diciembre
1	0,29	0,25	0,28	0,30	0,40	0,39
2	0,39	0,41	0,47	0,60	0,63	0,43
3	0,42	0,41	0,46	0,44	0,54	0,42
5	0,32	0,37	0,40	0,47	0,39	0,40
7	0,43	0,50	0,48	0,47	0,43	0,56
9	0,36	0,34	0,40	0,45	0,46	0,44
13	0,53	0,57	0,49	0,59	0,53	0,46
15	0,52	0,51	0,43	0,55	0,31	0,53
17	0,34	0,45	0,38	0,44	0,45	0,55
18	0,41	0,39	0,26	0,70	0,45	0,53
19	0,41	0,42	0,51	0,59	0,44	0,49
20	0,47	0,45	0,56	0,69	0,52	0,65
24	0,45	0,51	0,50	0,60	0,47	0,63
14	0,53	0,57	0,54	0,53	0,56	0,44
16	0,30	0,39	0,44	0,54	0,38	0,56
Promedio	0,41	0,44	0,44	0,53	0,46	0,50
DE	0,08	0,09	0,09	0,10	0,08	0,08
Valor mínimo	0,29	0,25	0,26	0,30	0,31	0,39
Valor máximo	0,53	0,57	0,56	0,70	0,63	0,65

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos al Dr. Pedro Contreras, patrocinante de mi memoria de título, por su gran apoyo, su paciencia y comprensión, guía fundamental para el desarrollo de este trabajo.

Agradezco al Dr. Fernando Wittwer, por su disposición y colaboración, facilitando un espacio en el laboratorio de patología clínica, en el cual realicé parte de mi estudio.

Agradezco de igual forma a Ricardo Chihualaf por su inmensa paciencia, por su apoyo y colaboración durante todo este tiempo.

A don Atilio, Sra. Helga por su atención cada vez que lo necesité durante mi trabajo en el laboratorio.

Agradezco a mi familia y mis amigos, que colaboraron de una u otra forma para el eficiente desempeño de mi trabajo.