

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias de la Salud

**Efecto del nivel de la suplementación de espirulina en el
estrés oxidativo, inmunidad y rendimiento productivo
durante el período de transición del ganado lechero en
pastoreo**

Proyecto de Investigación

Cindy Nathaly Garcés Román

Medicina Veterinaria

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de Médico Veterinario

Quito, 4 de agosto de 2017

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS DE LA SALUD

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Efecto del nivel de la suplementación de espirulina en el estrés oxidativo,
inmunidad y rendimiento productivo durante el período de transición del
ganado lechero en pastoreo**

Cindy Nathaly Garcés Román

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Christian Hernán Ponce Loyo, Ph.D.
PAS.

Firma del profesor

Quito, 4 de agosto de 2017

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: Cindy Nathaly Garcés Román

Código: 00119784

Cédula de Identidad: 1714820527

Lugar y fecha: Quito, 4 agosto de 2017

RESUMEN

Previas investigaciones sugieren que el ganado lechero en condiciones de pastoreo podrían tener mayores niveles de estrés oxidativo en comparación con animales confinados. Existe un producto de espirulina disponible en el mercado que contiene ficocianina que se ha caracterizado como un potente antioxidante. Sin embargo, hay pocos datos disponibles sobre la suplementación de este antioxidante en bovinos lecheros en condiciones de pastoreo durante el período de transición. Por lo tanto, el objetivo de este experimento fue evaluar los efectos de la suplementación de espirulina sobre el estrés oxidativo, inmunidad y el rendimiento productivo durante el período de transición en ganado lechero en pastoreo. Treinta vacas multíparas en gestación ($PV = 544 \pm 57$ kg) fueron utilizadas en este experimento, y fueron estratificadas por la fecha de parto esperada. Las vacas fueron asignadas aleatoriamente a tres grupos experimentales; 1) Control; sin suplementación de espirulina; 2) Espirulina-15 (15 g de espirulina; 2 g de ficocianina); y 3) Espirulina-30 (30 g de espirulina; 4 g de ficocianina). Los tratamientos iniciaron 3 semanas antes del parto y se mezclaron en un suplemento energético que ingerían diariamente en la mañana a una tasa de 3 kg/vaca (MS). El peso corporal y el índice de condición corporal se monitorearon los días - 21, 1, 14 en relación al parto. Se colectaron muestras de sangre en los mismos días, antes de la alimentación, para medir los indicadores de estrés oxidativo. Todas las vacas parieron en un período de 12 semanas y pastaron en el mismo potrero durante la fase experimental. El día del parto, se tomaron muestras de calostro y muestras de sangre de terneros para medir las concentraciones de IgG. Postparto, la producción de leche, los componentes de la leche y el recuento de células somáticas se monitorearon diariamente y semanalmente, respectivamente. El peso corporal, la pérdida de peso corporal y el índice de condición corporal no fueron alterados por el tratamiento ($P > 0.23$), sin embargo, en promedio las vacas tuvieron 2.7 y 4% de reducción en el peso corporal con respecto al inicio del ensayo. La capacidad antioxidante total no se vio afectada por la suplementación con espirulina ($P > 0.36$) en ningún punto de tiempo evaluado. Hubo una tendencia a un aumento cuadrático de la concentración de IgG en el calostro a medida que aumentó la suplementación con espirulina ($P = 0.10$). Sin embargo, no hubo diferencia en la concentración de IgG sérica de los terneros atribuida al tratamiento ($P = 0.88$). La producción de leche, los componentes de la leche y el recuento de células somáticas no fueron alteradas por el tratamiento ($P > 0.128$). Los resultados de este experimento no sugieren efectos positivos ni negativos de la suplementación con espirulina sobre el estrés oxidativo y el rendimiento productivo durante el período de transición del ganado lechero en pastoreo. Sin embargo, la respuesta de IgG por la suplementación con espirulina requiere una exploración adicional.

Palabras clave: Vacas lecheras, antioxidantes, espirulina, *Arthrospira platensis*

ABSTRACT

Previous data suggested that grazing dairy cattle could have higher levels of oxidative stress compared to confined animals. There is available a spirulina product containing phycocyanin which has been characterized as a potent antioxidant. Nevertheless, there is little data available on antioxidant supplementation on grazing dairy cattle during the transition period. Therefore, the objective of this experiment was to evaluate the effects of spirulina supplementation on oxidative stress, immunity and productive performance during the transition period by grazing dairy cattle. Thirty multiparous gestating cows (BW = 544 ± 57 kg) were enrolled in this experiment, and were stratified by expected calving date. Cows were aleatory assigned to 3 experimental groups; 1) Control; no supplementation of spirulina; 2) Spirulina-15 (15 g of spirulina; 2 g phycocyanin); and 3) Spirulina-30 (30 g of spirulina; 4 g phycocyanin). Treatments initiated 3 weeks before parturition and were mixed in an energy supplement fed daily in the morning at a rate of 3 kg/cow (DM). Body weight and body condition score were monitored at - 21, 1, 14 days, relative to calving. Blood samples were collected at the same time points before feeding to measure oxidative stress indicators. All cows calved within a period of 12 weeks, and graze in the same paddock during the experimental phase. The day of parturition colostrum samples and blood samples from calves were collected to measure IgG concentrations. After parturition milk production, milk components and somatic cell count were monitored daily and weekly, respectively. Body weight, body weight loss, and body condition score were not altered by treatment ($P > 0.23$), nevertheless in average cows had 2.7 and 4% reduction on body weight relative to the beginning of the trial. Total antioxidative capacity was not affected by spirulina supplementation ($P > 0.36$) at any time point measured. There was a tendency for a quadratic increased on IgG concentration in colostrum as spirulina supplementation increased ($P = 0.10$). Nevertheless, there was any difference on calves serum IgG concentration attributed to treatment ($P = 0.88$). Milk production, milk components, and somatic cell count were not altered by treatment ($P > 0.128$). Results from this experiment suggests nor positive or negative effects of spirulina supplementation on oxidative stress and productive performance during the transition period by grazing dairy cattle. However, IgG response by spirulina supplementation requires further exploration.

Key words: Dairy cattle, oxidative stress, spirulina, *Arthrospira platensis*

Efecto del nivel de la suplementación de espirulina en el estrés oxidativo, inmunidad y rendimiento productivo durante el período de transición del ganado lechero en pastoreo

C. N. Garcés¹, D. Vela², A. Mullo², V. Cabezas², A. Alvear² y C. H. Ponce¹

¹Escuela de Medicina Veterinaria, Colegio de Ciencias de la Salud, Universidad San Francisco de Quito USFQ, Quito 170901, Ecuador, ²Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Sangolquí, Ecuador 171-5-231B.

COMUNICACIÓN CORTA

Las vacas lecheras experimentan grandes adaptaciones fisiológicas y metabólicas durante el periodo de transición. El periodo de transición o periparturiente involucra tres semanas antes y tres semanas después del parto (Spears and Weiss, 2008). La demanda de oxígeno crece considerablemente cuando aumenta la demanda metabólica, lo que resulta en el incremento de las especies reactivas del oxígeno (ERO) (Sordillo and Aitken, 2009; Yuan et al., 2012). Las ERO son radicales libres derivados del oxígeno molecular y el anión superóxido, producido principalmente dentro de la mitocondria resultante de la cadena de transporte de electrones (Sordillo and Aitken, 2009). Varios estudios reportan que el estrés oxidativo tiene un rol en la etiología de enfermedades de las vacas lecheras particularmente en el periodo de transición en donde las respuesta inmunes e inflamatorias son disfuncionales (Bernabucci et al., 2005; Lykkesfeldt and Svendsen, 2007; Sordillo and Aitken, 2009).

El estrés oxidativo ocurre como resultado de un desequilibrio en donde el nivel de radicales libres excede la disponibilidad antioxidante endógena del animal. Durante el periodo periparturiente, se ha observado que la vaca está más expuesta a un mayor grado de estrés oxidativo (Bernabucci et al., 2005; Castillo et al., 2005; Sordillo and Aitken, 2009; Yuan et al., 2012). El daño oxidativo resultante de este desequilibrio incluye la modificación oxidativa de las macromoléculas celulares, la muerte celular por apoptosis o necrosis. Por ende, la acumulación de ERO puede dar lugar a un daño estructural en los tejidos de mamíferos. Los principales blancos biológicos de las ERO incluyen lípidos, proteínas, ADN y otras macromoléculas (Lykkesfeldt and Svendsen, 2007; Sordillo and Aitken, 2009).

El periodo de transición expone un intervalo de riesgo para trastornos metabólicos, ya que hay una adaptación metabólica que influencia además el estado oxidativo del animal (Turk et al., 2008). Múltiples enfermedades ocurren con mayor frecuencia durante el período periparturiente asociado con estrés oxidativo, estas incluyen mastitis, edema mamario, metritis y retención de membranas fetales (Sordillo and Aitken, 2009). No controlar adecuadamente el estrés oxidativo puede dar como resultado una mayor incidencia de problemas sanitarios (Yuan et al., 2012). Adicionalmente, el estrés oxidativo ha sido asociado con una disminución del nivel de defensas antioxidantes (Bernabucci et al., 2005; Pedernera et al., 2010; Sharma et al., 2011).

La terapia antioxidante proporciona un tratamiento alternativo a las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Lykkesfeldt and Svendsen, 2007). Los antioxidantes son cualquier sustancia que retrasa, previene o elimina el daño oxidativo a las moléculas blanco (Halliwell and Gutteridge, 2007 cit en Sharma et al., 2011). Los antioxidantes pueden atrapar eficazmente los intermediarios reactivos antes de provocar la oxidación a macromoléculas o reducir las biomoléculas que ya han sido oxidadas (Sordillo and Aitken, 2009).

Las intervenciones dirigidas a mejorar el estrés oxidativo han sido escasas, pero incluyen suplementos con vitamina C, vitamina E, y selenio (Lykkesfeldt and Svendsen, 2007). Se ha demostrado que la suplementación de selenio y vitamina E a niveles adecuados en vacas lecheras aumenta la fagocitosis, muerte bacteriana y el metabolismo oxidativo de los neutrófilos de la sangre periférica y de la glándula mamaria, en comparación con las vacas que son deficientes en esos micronutrientes. Además, ambos tienen la capacidad de controlar la acumulación de ERO intracelular y el estrés oxidativo (Sordillo and Aitken, 2009; Bernabucci et al., 2005; Spears and Weiss, 2008). La *Spirulina platensis*, ahora llamada *Arthrospira platensis*, es un alga azul-verde perteneciente a la familia de las cianobacterias (Belay, 2002; Zheng et al., 2013), considerada entre las más completas fuentes biológicas de proteínas, vitaminas, minerales y otros nutrientes y se ha estado investigando como complemento dietético-nutricional en pollos broiler, ratas y humanos (Baley, 2002; Sánchez et al., 2002). La ficocianina es uno de los principales constituyentes de la *S. platensis* asociado con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, hepatoprotectoras y de eliminación de radicales (Bhat and Madyastha, 2001; Zheng et al., 2013).

El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de la espirulina, principalmente de su compuesto ficocianina, en el estrés oxidativo, inmunidad y rendimiento productivo durante en el periodo de transición de vacas lecheras en condiciones de pastoreo. La hipótesis de trabajo fue que el uso de espirulina como suplemento antioxidante en vacas lecheras en pastoreo durante el periodo de transición tendrá una actividad positiva en parámetros fisiológicos, metabólicos y productivos.

El estudio fue llevado a cabo con treinta vacas Montbéliarde saludables, multíparas, no lactantes con un peso promedio inicial de 544 ± 57 kg. Los animales utilizados en el estudio se encontraban el periodo de transición, aproximadamente 21 preparto y 21 días postparto, eran mantenidos en la hacienda Guagrabamba, situado en el km 8 en la vía Aloag- Santo Domingo perteneciente al Cantón Mejía ($0^{\circ} 25' 54.6''$ Longitud $78^{\circ} 35' 52.4''$ Oe Latitud Sur) la temperatura oscila entre los 5.2 a 12.4 °C, está a 3.196 m sobre el nivel del mar. El estudio se realizó durante el periodo de marzo a junio de 2015. Todas las vacas parieron en un período de 12 semanas y pastaron en el mismo potrero durante la fase experimental, otorgándoles agua a voluntad. El potrero donde pastaron los animales era un potrero destinado exclusivamente para animales en el periodo de transición, el cual contenía una mezcla de kikuyo y raygrass (80%) y trébol (20%). El estudio fue realizado

tomando en cuenta las “Guidelines for Care and Use of Agricultural animals in Research and Teaching” (FASS, 2010).

Registros del peso corporal y la condición corporal se realizaron en los días -21, 1 y 14 en relación al parto. La condición corporal se realizó mediante el método de escala de 5 puntos, donde 1 = emaciado y 5 = obeso (Edmonson et al., 1989).

Los animales fueron estratificados de acuerdo a la fecha de parto esperada y asignadas aleatoriamente a uno de los 3 tratamientos experimentales. El primero grupo consistía en 10 animales bajo el régimen del tratamiento control, a los cuales no se les otorgaba suplementación de espirulina. El segundo grupo comprendía 10 vacas a las cuales se les suplementó en el alimento Espirulina-15 (15 g de espirulina; 2 g ficocianina) y el tercer grupo de 10 vacas tuvo una suplementación de Epirulina-30 (30 g de espirulina; 4 g ficocianina). Los tratamientos iniciaron 3 semanas antes de la fecha prevista de parto y se mezclaron junto a un suplemento energético (Bioalimentar, Ambato-Ecuador), que fue suministrado diariamente en la mañana a razón de 3kg/vaca. Al inicio del estudio, tanto el segundo como el tercer grupo recibieron Espirulina-15 por dos días y a partir del tercer día, el grupo 3 continuó con la suplementación de Espirulina-30. El consumo del tratamiento fue total, no hubo rechazo.

La producción de leche fue registrada diariamente para cada animal en cada ordeño desde el día del parto. El ordeño se realizó a las 6am y a las 3pm y la producción de leche y sus componentes fueron registrados hasta el día 14.

Se recogieron las muestras de leche semanalmente los días 7 y 14 de lactancia de cada individuo para determinar el conteo de células somáticas y medir los componentes de leche. Durante el periodo de lactancia, las muestras fueron colectadas de los medidores de leche para obtener una muestra representativa y medir sólidos totales, grasa, proteína, lactosa y conteo de células somáticas. Para el análisis de los componentes de la leche (sólidos totales, grasa, proteína y lactosa) se usó un analizador ultrasónico Ekomilk (Ekomilk M 90, Bulgaria). El conteo de células somáticas se realizó por citometría de flujo usando Fossomatic FC, Foss (Fossomatic 5000; Foss Electric A/S).

Se colectaron muestras sanguíneas de cada individuo antes de alimentarlos, mediante punción de la vena coccígea los días -21, 1 y 14 en relación con el parto. Se extrajo 10 ml de sangre en tubos sin anticoagulante para análisis de los indicadores de estrés oxidativo. Dentro de los 30 minutos posteriores a la toma de muestra, ésta fue centrifugada a $3000 \times g$ por 20 minutos a $4^{\circ}C$ y fueron almacenadas en condiciones comerciales a $-20^{\circ}C$ hasta la fecha del análisis.

El día de parto, se tomaron muestras de calostro a cada vaca y 24 horas postparto se colectó sangre de los terneros, la cual fue obtenida mediante punción de la vena yugular para medir las concentraciones de IgG. El proceso realizado para cada muestra fue el mismo realizado con las muestras sanguíneas de las vacas.

Las muestras colectadas a los ternero se utilizaron para la detección de IgG en suero que fue evaluada por la técnica de inmunofluorescencia y para la detección de proteínas IgG en el calostro tomado el día del parto se utilizó la técnica de inmunodifusión radial (Fahey

et al., 1965). Usando las muestras sanguíneas tomadas a las vacas los días -21, 1 y 14, se midió la capacidad antioxidante total (TAC) como indicador de estrés oxidativo. Ésta se mide de acuerdo a la técnica ABTS (ácido 2'2'-azinobis, 3 etilbenzotiazolin, 6-sulfónico), en donde se usa como reactivo al radical catiónico ABTS. Es un radical que presenta una coloración verde-azulada que una vez expuesto a la respuesta antioxidante se decolora y se mide utilizando un espectrofotómetro atemperado, siendo que mientras más decolorado se observe más capacidad antioxidante habrá en la muestra de estudio (Miller et al., 1993).

Los datos fueron analizados usando la versión 9.00 de SAS (SAS – Institute Inc., Cary, NC). Todas las variables paramétricas fueron analizadas usando el modelo mixto de SAS, los datos fueron analizados como diseño de bloques completamente al azar con tratamientos considerados como efectos fijos y el bloque como el efecto “random”. Polinomios ortogonales fueron usados para evaluar las respuestas lineales y cuadráticas dentro de la suplementación de espirulina. Las diferencias con un valor $P \leq 0.05$ fueron consideradas estadísticamente significativas y valores de $0.05 < P \leq 0.10$ fueron consideradas tendencias.

En este estudio no se registraron incidencias de trastornos reproductivos postparto durante el período experimental. De los animales usados, ninguno fue reemplazado, pero dos fueron excluidos. Uno de ellos abortó y por lo tanto no fue incluido en el experimento. El otro animal presentó una claudicación media por lo que recibió tratamiento y fue separado del grupo.

En el calostro se observó un incremento de los valores en la concentración IgG con el uso de Espirulina-15 (75.62 g/L) y 30g (69.03 g/L), los cuales tienden a incrementar de forma cuadrática ($P = 0.106$, Tabla 1). Las muestras de calostro tuvieron una concentración de IgG > 50 g/L, lo que demostró un calostro de calidad aceptable (Kehoe et al., 2011). Estos valores altos podrían deberse a que todas las vacas fueron multíparas y las concentraciones de IgG tienden a aumentar. Se sugiere también que la suplementación con espirulina mejoró las propiedades antioxidantes del calostro, como se ha observado previamente con la suplementación de otros antioxidantes como el selenio (Abuelo et al., 2014).

La concentración de IgG en el suero de los terneros no fue afectada por la inclusión de espirulina ($P > 0.881$), como se observa en la Tabla 1. Dentro de los principales factores que afectan el nivel de IgG en el ternero están: la edad del ternero, el número de partos de la vaca, la concentración de IgG en el calostro, método de administración y volumen de calostro consumido por el ternero (Weaver et al., 2000; Abuelo et al., 2014). Previamente, se ha determinado que la mayor concentración de IgG en suero es de 2 horas hasta 48 horas después de la ingesta de calostro presentando valores sobre 10 g/L (Klaus et al., 1968; Abuelo et al., 2014). En esta investigación los valores de calostro fueron de 7.37, 7.56 y 7.45 g/L para los grupos de control, Espirulina-15 y Espirulina-30, respectivamente. Es por esto que los valores bajos de la concentración de IgG en el suero de terneros, posiblemente se debieron a que la cantidad de calostro ingerida no fue suficiente, ya que la cantidad de inmunoglobulinas G en calostro fue alta. También podría ser que la ingesta de calostro no

fue inmediata al parto. Weaver et al. (2000) reporta que los terneros alimentados con anterioridad tienen concentraciones de IgG séricas significativamente más altas que los que fueron alimentados posteriormente, con concentraciones y volúmenes similares de calostro. Kamada et al (2007) reportaron que la fortificación del calostro con selenio al 1.0 y 3.0 ppm aumentó la concentración de IgG en el plasma de los terneros entre 20% y 42%, respectivamente.

El peso corporal y el índice de condición corporal son presentados en la Tabla 1 y no fueron afectados por el tratamiento ($P > 0.229$). El peso corporal promedio por grupo fue disminuyendo en el parto y al final del tratamiento, pero esta disminución no fue diferente entre los tres grupos. Sin embargo, en promedio las vacas perdieron 14.7 kg al día del parto (reducción del 2.7% del PV) y 22 kg al día 14 después del parto (reducción del 4% del PV). En cuanto a la condición corporal entre los grupos, ésta se mantuvo entre 2.77 a 2.98 (Tabla 1) y no se observan cambios significativos. De la misma manera, Boerman et al. (2014) reporta que el uso de los antioxidantes sintéticos etoxiquina y butil hidroquinona terciaria al 0.02% (base de materia seca) en la dieta de vacas lecheras en 163 días de producción no tuvo efecto en el peso, ni la condición corporal. Durante el periodo periparturiente, las vacas entran en un estado de balance energético negativo que es fisiológicamente inevitable (Grummer et al., 2004). Una demanda alta de nutrientes debido a la galactopoyesis provoca la movilización de las reservas del cuerpo para mantener la producción de leche (Esposito et al., 2014). Sin embargo, la ingesta de materia seca a medida que la vaca se acerca al parto disminuye, cuando la demanda de nutrientes aumenta (Grummer et al., 2004), esto hace que los animales presenten reducción en el peso y la condición corporal. Existe evidencia de que el estrés oxidativo es afectado por la condición corporal al parto (Bernabucci et al., 2005). Bernabucci et al. (2005) reportaron que las vacas monitoreadas durante el periodo de transición y antes del parto que presentaban un índice de condición corporal >3 (escala 1-5) movilizaban más reservas corporales en el periodo postparto y experimentan más estrés oxidativo que los animales con índices más bajos. También se puede pensar que la reducción del peso de los animales se debió a una menor ingesta de alimento. Comportamiento que se observa en varias situaciones en este periodo fisiológico.

El efecto de la adición de espirulina sobre el rendimiento de la producción y los componentes de leche se muestra en la Tabla 2. No se detectaron diferencias significativas sobre la producción de la leche. Sin embargo, en la primera semana hubo un incremento en la cantidad de leche (17%) usando *Espirulina-15* en contraste con el control y una disminución usando *Espirulina-30* con respecto al control. Postparto, en la semana dos se observó que la cantidad de la producción de leche usando espirulina aumentó numéricamente con respecto al control en 2.17kg. En otros estudios se encontró que las vacas que recibían 200g de espirulina diariamente en la dieta tuvieron un aumento del 21% en su producción de leche (Kulpys et al. 2009). En cuanto a la leche corregida por energía (CE), se observó una disminución de los valores con respecto al control. Esto posiblemente se debió a que el porcentaje de grasa disminuyó en la primera semana en los dos

tratamientos con espirulina, con respecto al control. Por otro lado, la leche CE y el porcentaje de grasa incrementaron numéricamente en la segunda semana usando espirulina.

La adición de espirulina tuvo una tendencia cuadrática a disminuir la concentración de sólidos totales ($P = 0.106$, Tabla 2) y de lactosa ($P = 0.079$, Tabla 2) en la primera semana postparto de tratamiento con relación al tratamiento. En contraste a nuestros resultados, Xu et al. (2014) observaron que la suplementación de luteína como antioxidante en la dieta en un grupo de vacas lecheras en el pico de lactancia aumentó el contenido de lactosa. Además, se concluyó que el uso de luteína es beneficiosa para el rendimiento y la producción de la leche en las vacas lactantes (Xu et al., 2014), lo que no ocurrió de manera significativa en nuestro estudio usando espirulina y teniendo en cuenta que el tratamiento fue durante el periodo periparturiente.

Las concentraciones de proteína total, proteína verdadera y grasa de la primera y segunda semana postparto no fueron diferentes entre los tratamientos ($P > 0.128$). De la misma manera, las concentraciones de lactosa y sólidos totales en la segunda semana tampoco tuvieron efecto alguno por la suplementación con espirulina. Vázquez-Añón et al. (2008) reportaron que usando el antioxidante sintético etoxiquina y butil hidroquinona terciaria en las dietas de vacas a los 171 días de producción, en una dieta que contenía 2% de grasa mostraba una tendencia a aumentar el rendimiento de la producción de leche. Sin embargo, He y Armentano (2011) concluyeron que el uso del mismo antioxidante sintético en vacas lecheras con promedio de 149 días de producción, no tuvo efecto sobre la producción de leche o los componentes de la leche con dietas que contenían 5% de aceites vegetales que variaban en su grado de insaturación. Es por esto que los resultados pueden ser variables entre el uso de antioxidantes.

El conteo de células somáticas (CCS) en los dos tratamientos con espirulina incrementaron con respecto al control tanto la primera como la segunda semana postparto. La segunda semana postparto el CCS tuvo una tendencia cuadrática a aumentar ($P = 0.015$) con el tratamiento de espirulina. El CCS ha sido usado como indicador de la salud de la glándula mamaria y de la calidad de la leche (Atakisi et al., 2010; Yuan et al., 2012). En Ecuador, el límite máximo permitido en los valores del CCS es de $500 \times 1000/\text{ml}$ según el Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN, 2015). Debido a que los valores del CCS son altos con respecto a los permitidos en Ecuador y otros países, se podría pensar en una mastitis subclínica. Por lo tanto esperaríamos una reducción en la producción de leche y cambios desfavorables en la composición de la leche (Ibrahim et al., 2016). Sin embargo, esto no fue observado en nuestro estudio, donde los valores en la producción de leche son altos en las dos semanas postparto. Atakisi et al. (2010) concluye que la mastitis subclínica altera el equilibrio oxidante / antioxidante que conduce a una disminución de los niveles de antioxidantes de la leche, reportando un TAC en leche de 0.54 mmol/L en vacas sanas vs. 0.42 mmol/L en vacas con mastitis subclínica. Además, se ha reportado que el CCS está positivamente relacionado con la peroxidación lipídica en la leche cruda, lo que sugiere una relación entre CCS y estrés oxidativo (Suriyasathaporn et al., 2006).

La capacidad antioxidante total (TAC) se midió en el suero de las vacas. Los valores promedios entre los tratamientos para cada toma de muestra fue de 1.14 mmol/L (ESM = 0.073), 1.12 mmol/L (ESM = 0.073) y 1.20 mmol/L (ESM = 0.070), en los días -21, 1 y 14 en relación al parto, respectivamente. Las concentraciones de TAC, no fueron alteradas por la suplementación de espirulina ($P > 0.360$). El TAC nos permite tener una idea de los niveles generales de antioxidantes en el cuerpo y nos provee información biológicamente relevante (Yokus et al., 2007). En vacas lecheras alimentadas con diferentes regímenes nutricionales los niveles de TAC estuvieron en un rango entre 0.937 mmol/L a 1.019 mmol/L. Además, las vacas lactantes tuvieron niveles de TAC más altos que las vacas secas (0.994 vs. 0.962 mmol/L) (Mandebvu et al., 2003). Estos niveles de TAC van paralelo a los encontrados en nuestro estudio. De igual manera, en otro estudio en vacas lecheras sanas vs. vacas con desplazamiento de abomaso, ambas en periodo de lactancia de 4 semanas promedio, se observó que los niveles de TAC promedio están en 0.90 mmol/L (Durgut et al., 2016). Por otro lado, Yokus et al. (2007) midieron los niveles de TAC a los 7 meses de gestación y a los 15 minutos postparto en vacas lecheras y encontraron que el TAC aumentaba en el periodo postparto en comparación con el preparto pero no significativamente en vacas con parto normal, 1.80 vs 1.72 mmol/L, respectivamente. En nuestro estudio no se reportaron valores altos de TAC en el parto, de hecho, en el día de parto, el TAC tuvo el menor valor promedio (1.12 mmol/L) con respecto al preparto (1.14 mmol/L) de manera no significativa, y en la segunda semana postparto el valor de TAC tuvo su mayor concentración (1.20 mmol/L). Patrones similares se observaron por Kankofer et al. (2010) en vacas lecheras con y sin retención placentaria, donde TAC aumentó en el período preparto, tuvo una fuerte disminución en el parto y después del parto, los valores de TAC incrementaron nuevamente hasta la tercera semana postparto, 5.17; 4.95 y 6.48 $\mu\text{mol/g}$ proteína, respectivamente.

Hay pocos datos sobre rangos fisiológicos de parámetros antioxidantes / oxidativos en la circulación general durante el período periparturiente en vacas y no hay información directa cuando aparece el estrés oxidativo (Kankofer et al., 2010). En el presente estudio, los valores de los niveles de TAC no variaron significativamente entre los grupos con tratamiento de espirulina y el control. Por lo tanto, el sistema de defensa antioxidante no se ve comprometido en las vacas lecheras por la suplementación de espirulina, asociado con valores similares en los niveles de TAC en las vacas de nuestro estudio con otros reportes. A pesar de tener un incremento en los niveles del CCS, los niveles de TAC, no disminuyeron, ni indican estrés oxidativos. Pero se recomienda realizar otros estudios con un mayor número de animales para verificar estos resultados.

Los resultados encontrados demuestran que las vacas en periodo de transición suplementadas con espirulina (Espirulina-15 y Espirulina-30) tuvieron una tendencia a aumentar la concentración de IgG en el calostro y en el porcentaje de lactosa. De igual manera, la producción de leche incrementó numéricamente con el uso de espirulina durante la segunda semana postparto. Además, el conteo de células somáticas aumentó significativamente con respecto al control, pero no se reporta ningún problema de mastitis.

La espirulina no afectó los niveles antioxidantes, ya que no se encontraron diferencias significativas en los niveles de TAC. Aún se necesitan más estudios para establecer los rangos fisiológicos de los perfiles antioxidantes y oxidantes en vacas.

La adaptación de las vacas lecheras durante el período periparturiente es importante para garantizar la eficiencia de los animales durante el periodo de producción. Nuestro conocimiento actual de la respuesta animal a la suplementación dietética de *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* es relativamente escaso. Nuestro estudio fue el primer experimento realizado usando *S. platensis* como antioxidantes. No hay estudios que demuestren la relación de la espirulina como antioxidante en vacas lecheras en pastoreo en el periodo periparturiente. Es importante realizar más estudios con el uso de espirulina para tener una mejor comprensión de cómo su función antioxidante puede prevenir el daño oxidativo a los tejidos del anfitrión y para conducir a estrategias más eficaces para evitar enfermedades y mejorar el rendimiento de las vacas lecheras durante el periodo de la transición.

REFERENCIAS

- Abuelo, A., M. Pérez-Santos, J. Hernández, and C. Castillo. 2014. Effect of colostrum redox balance on the oxidative status of calves during the first 3 months of life and the relationship with passive immune acquisition. *The Veterinary Journal*. 199:295–299.
- Atakisi, O., H. Oral, E. Atakisi, O. Merhan, S. Metin, A. Ozcan, A., S. Marasli, B. Polat, A. Colak, and S. Kaya. 2010. Subclinical mastitis causes alterations in nitric oxide, total oxidant and antioxidant capacity in cow milk. *Research in Veterinary Sci*. 89:10–13.
- Belay A. 2002. The potential application of *Spirulina (Arthrospira)* as a nutritional and therapeutic supplement in health management. *J. Am. Nutr. Assoc*. 5:27–48.
- Bernabucci, U., B. Ronchi, N. Lacetera, and A. Nardone. 2005. Influence of Body Condition Score on Relationships Between Metabolic Status and Oxidative Stress in Periparturient Dairy Cows. *Journal of Dairy Sci*. 88:2017–2026.
- Bhat, V. B., and K. M. Madyastha. 2001. Scavenging of Peroxynitrite by Phycocyanin and Phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: Protection against Oxidative Damage to DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 285:262–266.
- Boerman, J. P., C. L. Preseault, J. Kraft, H. M. Dann, and A. L. Lock. 2014. Effect of antioxidant supplementation on milk production, milk fat synthesis, and milk fatty acids in dairy cows when fed a diet designed to cause milk fat depression. *Journal of Dairy Sci*. 97:1077–1081.
- Castillo, C., J. Hernández, A. Bravo, M. Lopez-Alonso, V. Pereira, and J. L. Benedito. 2005. Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. *The Veterinary Journal* 169:286–292.
- Durgut, R., A. Sagkan, O. Ozturk, and M. Guzel. 2016. Evaluation of oxidative stress, antioxidant status and lipid profile in cattle with displacement of the abomasum. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*. 63:137-141.
- Edmonson, A. J., I. J. Lean, L. D. Weaver, T. Farver, and G. Webster. 1989. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci*. 72:68–78.
- Esposito, G., P.C. Irons, E. C. Webb, and A. Chapwanya, A. 2014. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. *Animal Reproduction Science*. 144:60– 71.
- Fahey, J. L., and E. M. Mickelvey. 1965. Quantitative Determination of Serum Immunoglobulins in Antibody-Agar Plates. *J. Immunol*. 94:84-90.
- FASS. 2010. Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching. 3rd ed. Federation of Animal Science Societies, Champaign, IL.
- Grummer, R. R., D. G. Mashek, and A. Hayirli. 2004. Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Vet Clin Food Anim*. 20:447–470.
- He, M., and L. E. Armentano. 2011. Effect of fatty acid profile in vegetable oils and antioxidant supplementation on dairy cattle performance and milk fat depression. *Journal of Dairy Sci*. 94:2481–2491.
- Ibrahim H. M. M., Y. Y. El-seedy, and N. A. Gomaa. 2016. Cytokine response and oxidative stress status in dairy cows with acute clinical mastitis. *J Dairy Vet Anim Res*. 3:1-6.
- INEN – Instituto Ecuatoriano de Normalización. 2015. Leche cruda – Requisitos. Norma Técnica Ecuatoriana INEN 9.

- Kamada, H., I. Nonaka, Y. Ueda, and M. Murai. 2007. Selenium Addition to Colostrum Increases Immunoglobulin G Absorption by Newborn Calves. *Journal of Dairy Sci.* 90:5665–5670.
- Kehoe, S.I., A. J. Heinrichs, M. L. Moody, C. M. Jones, and M. R. Long. 2011. Comparison of immunoglobulin G concentrations in primiparous and multiparous bovine colostrum. *The Professional Animal Scientist.* 27:176–180.
- Klaus, G., A. Bennett, and E. Jones. 1969. A Quantitative Study of the Transfer of Colostral Immunoglobulins to the Newborn Calf. *Immunology.* 16:293-299.
- Kankofer M., E. Albera, M. Feldman, N. Gundling, and M. Hoedemaker. 2010. Comparison of antioxidative/oxidative profiles in blood plasma of cows with and without retained fetal placental membranes. *Theriogenology.* 74:1385–1395.
- Kulpys, J., E. Paulauskas, V. Pilipavicius, and R. Stankevicius. 2009. Influence of cyanobacteria *Arthrospira (Spirulina) platensis* biomass additive towards the body condition of lactation cows and biochemical milk indexes. *Agronomy Research.* 7:823–835.
- Lykkesfeldt, J. and O. Svendsen. 2007. Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. *The Veterinary Journal* 173:502–511.
- Mandebvu, P., J. B. Castillo, D. J. Steckley, and E. Evans. 2003. Total antioxidant capacity: A tool for evaluating the nutritional status of dairy heifers and cows. *Can. J. Anim. Sci:* 605-608.
- Miller, N. J., C. Rice-Evans, M. J. Davies, V. Gopinathan, and A. Milner. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Sci.* 84:407-412.
- Pedernera, M., P. Celi, S. García, H. E. Salvin, I. Barchia, and W. J. Fulkerson. 2010. Effect of diet, energy balance and milk production on oxidative stress in early-lactating dairy cows grazing pasture. *The Veterinary Journal.*186:352–357.
- Sánchez, N., M. Bu, N. León, and H. Pérez. 2002. Fundamentos de una posible acción beneficiosa de la *Spirulina platensis* en las neuropatías periféricas. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962002000300008.
- Sharma, N., N. K. Singh, O. P. Singh, V. Pandey, and P. K. Verma. 2011. Oxidative Stress and Antioxidant Status during Transition Period in Dairy Cows. *Journal of Animal Sci.* 24:479-484.
- Sordillo, L. M. and S. L. Aitken. 2009. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 128:104–109.
- Spears, J. W. and W. P. Weiss. 2008. Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. *The Veterinary Journal.* 176:70–76.
- Suriyasathaporn, W., U. Vinitketkumnuen, T. Chewonarin, S. Boonyayatra, K. Kreausakon, and Y. H. Schukken. 2006. Higher somatic cell counts resulted in higher malondialdehyde concentrations in raw cows' milk. *Int. Dairy J.* 16:1088–1091.
- Turk, A. D. Juretic, D. Gerês, A. Svetina, N. Turk, and Z. Flegar-Mestric. 2008. Influence of oxidative stress and metabolic adaptation on PON1 activity and MDA level in transition dairy cows. *Animal Reproduction Sci.* 108:98–106.
- Vázquez-Añón, M., J. Nocek, G. Bowman, T. Hampton, C. Atwell, P. Vázquez, and T. Jenkins. 2008. Effects of Feeding a Dietary Antioxidant in Diets with Oxidized Fat

- on Lactation Performance and Antioxidant Status of the Cow. *Journal of Dairy Sci.* 91:3165–3172.
- Weaver, D. M., J. W. Tyler, D. C. VanMetre, D. E. Hostetler, and G. M. Barrington. 2000. Passive transfer of colostrum immunoglobulins in calves. *Journal of Veterinary Internal Medicine.* 14:569–577.
- Xu, C. Z., H. F. Wang, J. Y. Yang, J. H. Wang, Z. Y. Duan, C. Wang, J. X. Liu, and Y. Lao. 2014. Effects of feeding lutein on production performance, antioxidative status, and milk quality of high-yielding dairy cows. *Journal of Dairy Sci.* 97:7144–7150.
- Yokus, B., S. Bademkiran, and D. U. Cakir. 2007. Total anti-oxidant capacity and oxidative stress in dairy cattle and their associations with dystocia. *Medycyna Wet.* 63:167–170.
- Yuan, K., R. D. Shaver, S. J. Bertics, M. Espineira, and R. R. Grummer. 2012. Effect of rumen-protected niacin on lipid metabolism, oxidative stress, and performance of transition dairy cows. *Journal of Dairy Sci.* 95:2673–2679.
- Zheng, J., T. Inoguchi, S. Sasaki, Y. Maeda, M. McCarty, M. Fujii, N. Ikeda, K. Kobayashi, N. Sonoda, and R. Takayanagi. 2013. Phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis* protect against diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 304:110–120.

Tabla 1. Efecto de espirulina en anticuerpos, peso corporal, pérdida de peso y condición corporal (CC)

Variable	Tratamiento ¹			ESM ²	Contraste		
	Control	Espirulina-15	Espirulina-30		Lineal	Cuadrático	
IgG							
Calostro, g/L	63.06	75.62	69.03	4.98	0.386	0.106	
Suero, g/L	7.37	7.56	7.45	0.86	0.942	0.881	
Pesos							
Inicial, kg	548	536	547	22.25	0.973	0.664	
Parto, kg	531	525	526	19.24	0.839	0.885	
Final, kg	514	518	531	20.81	0.538	0.835	
Pérdida A, kg ³	17	11	16	1.33	0.960	0.702	
Pérdida B, kg ⁴	32	19	15	1.42	0.238	0.713	
CC inicial ⁵	2.77	2.84	2.90	0.08	0.229	0.971	
CC parto ⁵	2.86	2.89	2.89	0.08	0.737	0.856	
CC final ⁵	2.91	2.98	2.90	0.08	0.889	0.389	

¹Los tratamientos fueron sin suplementación (Control), suplementación de Espirulina-15 (15g espirulina, 2g ficocianina) y Espirulina-30 (30g espirulina, 4g ficocianina).

²ESM = error estándar de la media.

³A = pérdida de peso desde el inicio del tratamiento hasta el parto.

⁴B = pérdida de peso desde el inicio del tratamiento al día 14.

⁵CC = condición corporal (1 = emaciado; 5 = obeso)

Tabla 2. Efectos de la suplementación de Espirulina en la Producción y Componentes de la Leche

Variable	Tratamiento ¹			ESM ²	Contraste	
	Control	Espirulina-15	Espirulina-30		Lineal	Cuadrático
Semana 1						
Sólidos Totales, %	14.20	12.12	12.91	0.76	0.221	0.106
Proteína total, %	4.07	4.21	4.16	0.18	0.612	0.493
Proteína verdadera, %	3.85	3.95	3.90	0.17	0.749	0.564
Grasa, %	4.63	2.83	3.07	0.72	0.140	0.231
Lactosa, %	5.45	5.08	5.57	0.23	0.656	0.079
CCS, ×1000/ml ³	259.79	936.93	869.14	451.25	0.324	0.463
Leche, kg	20.03	23.52	19.37	2.46	0.847	0.189
Leche CE, kg ⁴	23.41	20.83	17.95	3.24	0.226	0.966
Proteína, kg	0.80	0.90	0.77	0.09	0.812	0.281
Grasa, kg	1.00	0.64	0.58	0.19	0.140	0.499
Semana 2						
Sólidos Totales, %	12.20	13.10	12.91	0.52	0.336	0.361
Proteína total, %	3.76	3.71	3.80	0.12	0.792	0.593
Proteína verdadera, %	3.54	3.51	3.58	0.11	0.807	0.639
Grasa, %	2.87	4.07	3.49	0.49	0.367	0.128
Lactosa, %	5.60	5.31	5.59	0.19	0.976	0.149
CCS, ×1000/ml ³	296.11	1816.00	589.00	442.49	0.628	0.015
Leche, kg	21.40	23.57	23.66	2.81	0.555	0.759
Leche CE, kg ⁴	18.88	24.37	22.66	3.40	0.409	0.333
Proteína, kg	0.76	0.81	0.84	0.09	0.520	0.860
Grasa, kg	0.62	0.98	0.84	0.18	0.389	0.227

¹Los tratamientos fueron sin suplementación (Control), suplementación de Espirulina-15 (15g espirulina, 2g ficocianina) y Espirulina-30 (30g espirulina, 4g ficocianina)

²ESM = error estándar de la media

³CCS = conteo de células somáticas

⁴Fórmula Leche corregida por la energía (CE):

EC=(Producción de leche (kg)×(0.383×%grasa+0.242×%TProteína+0.7832))/3,1138