

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

PROTEÍNA ASOCIADA A LA GESTACIÓN (PAG) EN VACAS LECHERAS
HOLANDO Y NORMANDO Y SU CORRELACION CON METABOLITOS
SANGUÍNEOS Y COMPOSICIÓN DE LA LECHE

Por

Maria Gimena MACHADO STRECCIA

TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el título
de Ingeniero Agrónomo

MONTEVIDEO
URUGUAY
2022

Tesis aprobada por:

Director:

Ing. Agr. PhD. Andrea Álvarez-Oxiley

Codirector:

Ing. Agr. MSc. Ezequiel Jorge Smeding

Ing. Agr. PhD. Laura Astigarraga

DMTV. MSc. Carlos Batista

Fecha:

20 de mayo de 2022 _____

Autor:

Maria Gimena Machado Streccia

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a mi familia, por el apoyo incondicional, por brindarme la oportunidad de estudiar y acompañarme en el proceso con mucho amor y comprensión.

A mi tutora Andre y a mi cotutor Eze, por trabajar codo a codo con muy buena disposición y gran compromiso en este trabajo.

A mi pareja por incentivarne a seguir adelante y culminar esta etapa de formación. También agradezco a los amigos por su confianza y cariño a lo largo del camino.

A la Facultad de Agronomía y en especial a todas las personas que trabajan en la Estación Experimental Bernardo Rossengurtt por su colaboración. A Maria André por compartir sus resultados de tesis y a la Ing. Agr. Laura Astigarraga por permitirnos descubrir la raza Normando.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PAGINA DE APROBACION	II
AGRADECIMIENTOS	III
LISTA DE TABLAS E ILUSTRACIONES	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. LA LECHERIA EN URUGUAY.....	2
2.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS GENOTIPOS LECHEROS EN SISTEMAS DE BAJO DEPENDENCIA DE INSUMOS EXTERNOS	3
2.3. EFECTO DEL GENOTIPO SOBRE EL PV Y LA CC.....	5
2.4. CURVA DE PRODUCCIÓN DE LECHE Y SU COMPOSICIÓN...6	6
2.5. DINÁMICA FISIOLÓGICA Y PARTICIÓN DE LA ENERGÍA EN UN CICLO BIOLÓGICO Y SU EFECTO SOBRE LA REPRODUCCIÓN	7
2.5.1. <i>Efectos genéticos y de manejo sobre la producción de leche y la fertilidad</i>	8
2.5.2. <i>Factores de la lactancia temprana que afectan la fertilidad subsecuente</i>	9
2.5.3. <i>Pérdida de condición corporal y balance energético negativo (BEN)</i>	9
2.5.4. <i>Desórdenes metabólicos</i>	12
2.5.4.1. <i>Metabolismo glucídico</i>	12
2.5.4.2. <i>Metabolismo lipídico</i>	14
2.5.4.3. <i>Metabolismo proteico</i>	17
2.5.5. <i>Reinicio de la ciclicidad</i>	18
2.6. FACTORES QUE AFECTAN LA FERTILIDAD DURANTE LA ÉPOCA REPRODUCTIVA	20
2.6.1. <i>Comportamiento estral</i>	20
2.6.2. <i>Mortalidad embrionaria</i>	21
2.7. GESTACIÓN Y HORMONAS DE LA GESTACIÓN.....	23
2.7.1. <i>Función endocrina de la placenta</i>	25
2.7.2. <i>Proteínas asociadas a la gestación (PAGs)</i>	25
2.7.3. <i>Concentración de PAG durante el curso normal de la gestación</i>	28
2.7.4. <i>Factores que pueden influenciar las concentraciones maternas de PAG</i>	29
3. HIPOTESIS	30
4. OBJETIVOS	30

4.1.1. <i>Objetivo general</i>	30
4.1.2. <i>Objetivos específicos</i>	30
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
5.1. LOCALIZACIÓN Y DISEÑO EXPERIMENTAL	31
5.2. CONDICIONES CLIMÁTICAS DURANTE EL EXPERIMENTO Y DIETA DE LOS ANIMALES	31
5.3. MEDICIONES Y MUESTREOS	33
5.3.1. <i>Principio de la técnica de ELISA tipo sándwich y cálculo de la concentración de PAG.</i>	33
5.4. CALCULOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	34
6. RESULTADOS.....	36
6.1. PERFILES DE CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE PAG	36
6.2. MODELACIÓN EXPLORATORIA DE LA PAG EN FUNCIÓN DE LOS DÍAS DE GESTACIÓN.....	38
6.3. CORRELACIONES ENTRE LA PAG Y CARACTERÍSTICAS DE LA PRODUCCIÓN LECHERA PARA LOS GENOTIPOS HF Y N EN UN SPBI..	40
7. DISCUSIÓN	44
8. CONCLUSIONES	51
9. RESUMEN	52
10. SUMMARY	53
11. BIBLIOGRAFÍA	54
12. ANEXOS	81

LISTA DE TABLAS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
Cuadro 1. Producción y composición de leche según la raza.	7
Cuadro 2. Resultados de ANOVA para PV, CC, LCGP y PAG en vacas H y N.	36
Cuadro 3. Modelos polinómicos de ajuste de la concentración plasmática de PAG en función de los DG para cada raza.....	38
Cuadro 4. Correlaciones entre la (PAG) y características de la producción lechera para los genotipos lecheros HF y N en un SPBI.	40
Cuadro 5. Correlaciones entre la PAG y características la producción y composición de leche para HF y N en un SPBI.	41
Figura No.	Página
Figura 1. Vacas de raza Normando y Holando	4
Figura 2. Concentraciones plasmáticas de NEFA y BHB en vacas multíparas entre 15 y 60 días posparto	16
Figura 3. Representación esquemática de la migración de las células binucleadas desde el trofoectodermo hasta su fusión con las células del endometrio uterino.	26
Figura 4. Perfiles plasmáticos de PAG (media \pm SD) en vacas gestantes .	28
Figura 5. Esquema grafico de la estrategia de alimentación.	32
Figura 6. Esquema de la técnica de ELISA tipo sándwich.	34
Figura 7. Curvas de PV, CC, LCGP, PAG del ciclo productivo de vacas H y N.	36
Figura 8. Curvas de modelación de la PAG en función de los DG en un ciclo biológico de vacas HF y N, en un SPBI.....	39
Figura 9. Correlación entre la PAG y NEFA (A) y PAG y % de Lactosa (B) para los genotipos HF y N, en un SPBI.	42
Figura 10. Gráficos de regresión local de la concentración plasmática de PAG (A), CEN (B) y BE (C) según la raza, entre los -15 y 288 DG.	43

TABLA DE ABREVIACIONES

%G	Porcentaje de grasa
%L	Porcentaje de lactosa
%P	Porcentaje proteína
AA	Aminoácidos
ABS	Absorbancia
BE	Balance energético
BEN	Balance energético negativo
BHB	Betahidroxiburato
CC	Condición corporal
CMS	Consumo de materia seca
DG	Días de gestación
DPP	Días postparto
ELISA	Enzimoinmunoanálisis de absorción
FSH	Hormona Folículo Estimulante
GH	Hormona de crecimiento
GnRH	Hormona liberadora de Gonadotrofina
HF	Holstein Friesian
IPC	Intervalo Parto-Concepción
LH	Hormona Luteinizante
N	Normando
NEFA	Ácido graso no esterificado
NG	Neoglucogénesis
PAG	Proteínas asociadas a la gestación
PL	Producción de leche
PLCGP	Producción de leche corregida por grasa y proteína
PU	Peso del útero
RIA	Radioinmunoanálisis
SPBI	Sistema pastoril de baja dependencia de insumos externos
SL	Semana de lactación
TAG	Triglicéridos
TMR	Dieta totalmente mezcla

1. INTRODUCCIÓN

La explotación lechera en el Uruguay ocupa el 5 % de la superficie del territorio, siendo el sector con mayor ingreso de exportaciones por hectárea. Si bien la producción nacional presentó una leve caída en la cantidad total de productores, cabezas de ganado y superficie total ocupada por el rubro, la producción lechera se ha incrementado en productividad y eficiencia (MGAP. DIEA, 2020).

Durante 2020 la remisión de leche a planta superó todos los registros desde que se llevan datos, con el menor número de remitentes y la mayor remisión diaria individual. Lo que refleja la intensificación de la producción y la adopción de nuevas tecnologías para mejorar los procesos productivos y reproductivos.

Un dato interesante relevado por la encuesta lechera realizada por INALE y MGAP en 2019, es que 25% de los establecimientos encuestados, considera cambiar el biotipo de vaca como una tecnología innovadora. Lo que manifiesta la importancia de adecuar el tipo de vaca, ya que la capacidad de la vaca para adaptarse en respuesta a los desafíos ambientales y nutricionales afecta la sostenibilidad del sistema de producción.

La nutrición juega un papel crucial en la fisiología reproductiva y la endocrinología de la vaca lechera. Después del parto la vaca experimenta una mayor demanda de nutrientes para la producción de leche y los sistemas de pastoreo se asocian con frecuencia a déficits nutricionales debido a su alta dependencia de la producción y asignación de pastos (Horn et al., 2014).

Metabolitos y hormonas metabólicas asociadas a la priorización energética para la producción de leche (Ácidos grasos no esterificados (NEFA), β -hidroxibutirato (BHB), insulina, glucosa, IGF-1), influyen en la fertilidad, y surge un conflicto en las necesidades metabólicas en las que las razas exclusivamente lecheras pueden priorizar la producción de leche en detrimento de las funciones reproductivas y la fertilidad, mientras que las razas doble propósito tienen una mayor capacidad de adaptación a ambientes exigentes.

Actualmente un 90 % del rodeo lechero nacional está constituido por la raza Holando Frisian (HF), sin embargo se han reportado estudios internacionales y nacionales (Jorge-Smeding et al., 2021) acerca de la capacidad de adaptación de distintas razas o biotipos lecheros a sistemas pastoriles de baja dependencia de insumos externos (SPBI).

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. LA LECHERIA EN URUGUAY

En Uruguay la producción lechera ocupa 756.812 hectáreas aproximadamente, concentrándose el 64% de los establecimientos en la cuenca tradicional del litoral, sobre los departamentos de San José, Colonia y Florida (MGAP. DIEA, 2020).

También se ha desarrollado la cuenca Noreste, a la que se la califica como “no tradicional” por estar en una región donde los recursos naturales no permiten alcanzar los máximos niveles productivos (Cerro Largo, Tacuarembó y Rivera). Cerro Largo es el departamento de la región que tiene la mayor cantidad de predios lecheros (46%), seguido por Tacuarembó y Rivera con el 38% y 16% (Astigarraga et al., 2019).

La lechería se desarrolla sobre sistemas de base pastoril, de manera que exhiben un desbalance estructural entre oferta y demanda de nutrientes a lo largo del ciclo productivo, ya que la producción de leche acompaña la producción estacional de las pasturas, registrándose en primavera el máximo de producción (Meikle et al., 2013).

Según datos nacionales¹ la base forrajera utilizada en la producción láctea está compuesta por un tercio del suelo con campo natural, 30% de praderas permanentes, 18% de cultivos forrajeros anuales y 8% de campo mejorado. En cuanto a la región Noreste, el campo natural representa más de dos terceras partes de la estructura forrajera de los predios; las praderas permanentes, cultivos forrajeros anuales y campo mejorado se presentan en proporciones del 10%, 9% y 5% respectivamente. Esto evidencia características poco intensivas de esta producción respecto al país, con niveles inferiores de adopción tecnológica en un aspecto central como lo es la base nutricional del rodeo lechero (Astigarraga et al., 2019).

Actualmente el rodeo lechero nacional está constituido aproximadamente por 400.000 vacas masa de las cuales 76% corresponde a la raza HF Americano, 14% a HF Neozelandés, 5% cruza, 4% Jersey y 1% Normando (MGAP. DIEA, 2020). Datos de evaluaciones genéticas uruguayas han demostrado una predominancia de la raza Holando,

¹ MGAP. DICOSE. 2011. Com. personal.

principalmente proveniente de América del Norte, debido a su elevada producción lechera (Meikle et al., 2013).

La utilización de genotipos de altos rendimientos lecheros, han provocado problemas relacionados a la reproducción y sanidad de la vaca lechera, se cuenta con datos nacionales los cuales avalan que el aumento de la producción contrajo una elongación en el intervalo parto-concepción (Rovere et al., 2007, Meikle et al., 2013).

Los SPBI en particular, tienen una alta dependencia de la oferta forrajera, en este sentido, se sabe que en los sistemas pastoriles el consumo de materia seca (CMS) está limitado, y por lo tanto los animales de alto mérito genético son incapaces de expresar todo su potencial genético (Kolver y Müller, 1998).

En este contexto, las respuestas adaptativas fisiológicas a los déficits nutricionales juegan un papel central debido a la flexibilidad requerida para constituir y movilizar las reservas corporales (Blanc et al., 2004).

2.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS GENOTIPOS LECHEROS EN SISTEMAS DE BAJO DEPENDENCIA DE INSUMOS EXTERNOS

La raza HF es originaria de Frisia, Países Bajos (Frenche et al., 1968), y existen varios biotipos de los cuales se destaca el HFA por ser el que tiene mayor presencia en el mundo. Las vacas adultas de este biotipo se caracterizan tener un peso vivo (PV) promedio en torno a 600 kg, altas producciones individuales de leche y un fenotipo de carácter fuertemente lechero (Figura 1).

El ganado N proviene de la región de Normandía, Francia, y ha sido seleccionado buscando el equilibrio entre la producción de leche y carne por lo que se trata de una raza doble propósito que se caracterizan por tener una buena conformación carnicera (Frenche et al., 1968) (Figura 1).



Figura 1. Vacas de raza Holando y Normando.

Las distintas razas o biotipos lecheros se caracterizan, entre otras cosas, por el PV adulto y las prioridades de partición de la energía entre leche y reservas corporales. Así, se tiene que los genotipos seleccionados para alto nivel de producción de leche individual tienden a presentar menor CC que aquellos seleccionados por contenido de sólidos o razas doble propósito (Roche et al., 2006, Delaby et al., 2009, Pereira et al., 2010a, Reiche et al., 2015).

Si bien se han reportado pocos trabajos con Normando, se ha observado que en el promedio de la lactancia las vacas de esta raza presentan mayor PV y CC que animales HF, tanto en vacas múltíparas (Dillon et al., 2003, Delaby et al., 2009) como primíparas (Reiche et al., 2015). No obstante, Bedere et al. (2016) reportaron similar CC y PV en vacas primíparas N y HF al parto.

En lo que respecta a la reproducción, si bien pueden presentar algunas diferencias en el retorno a la ciclicidad post parto (Delaby et al., 2009, Delaby et al., 2015); la fisiología reproductiva básica y el comportamiento hormonal se describe de manera similar para ambos genotipos. Se ha propuesto que las razas de doble propósito probablemente podrían responder mejor a las limitaciones nutricionales en los sistemas lecheros basados en pastos y forrajes. Las vacas N, podrían tener una mejor capacidad para hacer frente a los déficits nutricionales en comparación con las vacas HF (Delaby et al., 2009).

Vacas de alto rendimiento han sido seleccionadas para producir más leche en gran parte a través de su capacidad para movilizar grasa y músculo para apoyar la producción de leche en la lactancia temprana. Esto da como resultado una pérdida de la condición corporal y se asocia con alteraciones en los perfiles de metabolitos y hormonas en la sangre que, a su vez, influyen en la fertilidad (Pryce et al., 2001, Taylor et al., 2003).

Por tanto, las respuestas adaptativas dependen de la severidad y duración del período de déficit nutricional, y son diferentes según el genotipo de la vaca (Blanc et al., 2004). De hecho, las razas lecheras con un alto mérito genético generalmente no pueden superar los desafíos de los entornos nutricionales deficientes (Horan et al., 2005).

2.3. EFECTO DEL GENOTIPO SOBRE EL PV Y LA CC

Investigaciones nacionales (Pereira et al., 2010a) e internacionales (Dillon et al., 2003, Roche et al., 2006) han reportado que el PV y la CC pueden estar afectados por los biotipos o líneas genéticas intra raciales. En general, los biotipos HF seleccionados para alta producción tienden a tener menores niveles de reservas corporales y a perder más unidades de CC durante la lactancia temprana (Pereira et al., 2010a). Así mismo, ha sido reportado que vacas N seleccionadas para alta producción individual (con igual CC y PV al parto) perdieron CC más rápidamente que aquellas seleccionadas por altos contenidos de sólidos en la leche (Bedere et al., 2016).

Las razas o biotipos de alta producción no solamente pierden más unidades de CC y PV (Roche et al., 2009) sino que lo hacen por mayores períodos de tiempo (Pires et al., 2015) y tienen tasas más lentas de recuperación durante la lactancia media y tardía (Dillon et al., 2003, Yan et al., 2006, Pires et al., 2015). Reiche et al. (2015), en vacas primíparas, reportaron que la raza HF tuvo una mayor pérdida de CC y menor estado corporal en el nadir que el N. Asimismo, la tasa de recuperación de la CC fue similar entre ambas razas y las vacas N acumularon una mayor ganancia de PV al completar la primera lactancia.

Resultados similares han sido observados por Delaby et al. (2009) con vacas primíparas y multíparas en condiciones predominantemente pastoriles.

2.4. CURVA DE PRODUCCIÓN DE LECHE Y SU COMPOSICIÓN

Teóricamente, el ciclo productivo de la vaca lechera está dado por un parto por año en donde la lactancia ocupa 305 días y el período seco 60 días (Schmidt et al., 1984). La curva típica de producción de leche presenta dos etapas bien diferenciadas: una primera, que comienza inmediato al parto y que se caracteriza por un incremento diario en la producción de leche hasta llegar a un máximo (pico de PL), seguida de una segunda, donde se da un decremento relativamente constante en la producción diaria. A su vez, la lactancia suele dividirse en tercios, y normalmente el pico de PL ocurre entre la cuarta y octava semana post parto (Wood, 1967, Keown et al., 1986).

En países templados con sistemas de base pastoril, a diferencia de la curva típica que ocurre asociada a los partos de primavera, las lactancias de otoño generalmente presentan dos picos de producción (Naya et al., 2001, Garcia y Holmes, 2001).

En investigaciones nacionales el análisis de las curvas de lactancia sugiere que los animales no logran expresar su potencial productivo, seguramente en respuesta al desacople entre requerimientos-oferta de nutrientes y ambiente productivo (Chilibroste et al., 2012).

La caída en la PL durante el invierno indicaría que los sistemas pastoriles no logran cubrir los requerimientos nutricionales para que se exprese el potencial de PL, hecho que se revierte luego en la primavera (Garcia y Holmes, 2001) vinculado a la estacionalidad de la producción de pasturas (Wood, 1972).

Realizando una observación de la producción de leche y las diferencias entre las razas; según los datos obtenidos de registros de Mejoramiento Lechero de los últimos años (2016-2020); los kilos de sólidos promedio por lactancia corregida a 305 días, la raza HF marco en promedio 6736 litros anuales, 199 kg de proteínas (2,95%p) y 214 kg grasa (3,2%g).

Por otro lado, la raza N promedió 4527 litros anuales, 144 kg proteínas (3,2%p) y 162 kg de grasa (3,6%g). Analizando estos valores podemos decir que, pese a que el

porcentaje de sólidos es mayor en la raza N, la raza HF compensa con la cantidad de litros producidos, haciendo que la suma final de sólidos sea mayor en esta última².

Cuadro 1. Producción y composición de leche según la raza.

Características	Razas	
	Holando	Normando
Producción de leche (Kg/vaca/día)*	22,3±2,4	14,3±2,2
Proteína (g/Kg)	30,6±2,1	35,4±1,2
Grasa (g/Kg)	38,6±5,0	43,4±4,2
Lactosa (g/Kg)	482,5±16,0	504,5±26,2
Conteo de células somáticas (células/ml)	113.500±139.189	126.000±94.752

Fuente: adaptado de Le Guillou et al. (2019).

2.5. DINÁMICA FISIOLÓGICA Y PARTICIÓN DE LA ENERGÍA EN UN CICLO BIOLÓGICO Y SU EFECTO SOBRE LA REPRODUCCIÓN

Los aumentos en la producción de leche logrados en las últimas décadas han proporcionado evidencia de una relación antagónica entre la alta producción de leche y el éxito reproductivo en las vacas lecheras (Nebel y McGilliard, 1993, Bagnato y Oltenacu, 1994).

Se espera que la vaca lechera de alto rendimiento produzca una cantidad sustancial de leche cada año y, al mismo tiempo, conciba y mantenga una gestación a término. Para cumplir con el potencial de producción de por vida, se debe lograr un equilibrio entre el rendimiento, la fertilidad y otros factores influyentes. Cualquier incapacidad por parte del sistema de manejo para identificar y corregir problemas o por parte de la vaca para hacer frente a las demandas metabólicas, resulta en problemas productivos o de bienestar animal (Taylor et al., 2004).

Al final de la gestación y al comienzo de la lactancia, los requisitos de nutrientes para el crecimiento fetal y la síntesis de leche aumentan drásticamente y la vaca no puede satisfacer estas demandas energéticas de su consumo de alimento. Por lo tanto, la mayoría de las vacas entran en un período de balance energético negativo (BEN) (Wathes et al.,

² Sotelo, F. 2021. Com. personal.

2007a) donde la vaca tiene que movilizar sus reservas corporales para suplir el déficit de ingesta y cubrir los requerimientos energéticos (Pereira et al., 2010a).

La duración y la profundidad del BEN varían según el mérito genético, la condición corporal previa al parto, la producción de leche y el consumo de alimento (Grummer, 1995), en general, el CMS se reestablece entre la semana de lactancia (SL) 8 y 22 (Ingvarsen y Andersen, 2000) por lo que las vacas se encuentran en BEN típicamente hasta los 4 meses posparto (Knight, 2001). Sin embargo, Beever et al. (1998) han observado situaciones en las que el restablecimiento del balance energético positivo se alcanza luego de las 20 semanas de lactancia.

Las vacas lecheras de alta producción movilizan reservas corporales y pierden condición corporal para mantener su producción de leche hasta que su consumo de alimento pueda igualar o superar los requisitos. Este estado se caracteriza además por cambios en los perfiles metabólicos individuales como, por ejemplo, aumentos en los niveles plasmáticos de ácidos grasos no esterificados (NEFA), betahidroxibutirato (BHB) y urea (Leroy et al., 2008b).

La actividad ovárica y la eficiencia reproductiva después del parto también están estrechamente relacionadas con el balance energético de la vaca en términos de consumo de nutrientes y producción de leche (Butler y Smith 1989, Lucy et al., 1991).

2.5.1. Efectos genéticos y de manejo sobre la producción de leche y la fertilidad

La fertilidad es un rasgo multifactorial y su deterioro ha sido causado por una red de factores genéticos, ambientales y de gestión y sus complejas interacciones dificultan determinar la razón exacta de esta disminución (Walsh et al., 2011).

El síndrome de subfertilidad surge de la interacción del sistema de manejo, el biotipo y los procesos metabólicos que subyacen en ese aumento de la producción (Gutierrez et al., 2006).

El manejo inadecuado de vacas lecheras de alta producción puede contribuir significativamente a la causa de la baja fertilidad en lugar de efectos genéticos directos (LeBlanc, 2010).

Comprender las interacciones entre el genotipo y el medio ambiente es crucial para optimizar las estrategias de manejo de salud y la nutrición en paralelo con un programa de cría más equilibrado y así lograr altos niveles de eficiencia productiva y reproductiva.

2.5.2. Factores de la lactancia temprana que afectan la fertilidad subsecuente

Después del parto, el proceso de volver a quedar preñada en las vacas lecheras comienza con la involución del útero, seguido de la reanudación de la actividad ovárica. Esto debería dar como resultado la finalización del crecimiento de un folículo sano, que encierra un ovocito competente y, en última instancia, el celo, la ovulación, la fertilización y la fijación uterina por un embrión viable (Leroy et al., 2008b).

Pero como se mencionó anteriormente, la fertilidad es un rasgo multifactorial y su deterioro es causado por una red de eventos en el período posparto que impactan la fertilidad subsiguiente de las vacas, una vez que comienza la temporada de servicios (Walsh et al., 2011).

Además, los eventos en el período posparto también están influenciados por el manejo preparto, más notablemente el manejo nutricional (Overton y Waldron, 2004; Roche, 2006). Por lo que una mala nutrición durante el período previo al parto puede hacer que una vaca al parto sea más susceptible a un aumento de los trastornos metabólicos, a la pérdida de condición corporal (CC) y a un balance energético negativo más grave (Walsh et al., 2011).

Cerca del período de servicio, la vaca alcanza su producción máxima de leche y cualquier alteración en el estado metabólico o de energía en ese momento es probable que afecte su salud física y su capacidad de concepción (Taylor et al., 2004).

2.5.3. Pérdida de condición corporal y balance energético negativo (BEN)

El conflicto en el desempeño productivo vs el reproductivo está en gran parte condicionado por el manejo diferencial en el que se puede incidir especialmente durante el período de transición. La transición del estado preñada no lactante al no preñado lactante

es un período de cambios drásticos para la vaca. Ésta debe adaptar su metabolismo a las fuertes exigencias que le demanda la producción de leche desfasado de la capacidad de ingesta requerida, promoviendo la movilización de reservas corporales, es decir, promoviendo el BEN (Grummer, 1995).

Este estado es caracterizado además por cambios en los perfiles metabólicos individuales como por ejemplo, aumentos en los niveles plasmáticos de ácidos grasos no esterificados (NEFA), betahidroxibutirato (BHB) y urea. También el eje somatotrófico (hormona de crecimiento (GH), insulina e IGF-1) responde a los cambios nutricionales y tiene numerosos efectos sobre los ovarios y el útero (Taylor et al., 2004).

Los principales cambios adaptativos ocurren alrededor del parto. El período seco tardío coincide con la última fase del crecimiento fetal cuando aumentan los requerimientos de nutrientes. A los pocos días del parto, mediante cambios endócrinos y metabólicos (Holtenius et al., 2003) hay un redireccionamiento del metabolismo hacia la glándula mamaria en orden de proveer la energía y los nutrientes necesarios para la síntesis láctea (Bauman y Currie, 1980, Lucy et al., 2001, Pires et al., 2015).

Durante el inicio de la lactancia los requerimientos de glucosa, aminoácidos (AA) y ácidos grasos aumentan drásticamente, se ha estimado que durante la primera semana de lactancia los requerimientos serían, respectivamente, 2.7, 2.0 y 4.5 veces mayores que los requerimientos del último tercio de gestación para el crecimiento del conceptus (Bell, 1995).

Las consecuencias de BEN grave son un mayor riesgo de enfermedades metabólicas, que ocurren en gran medida durante el primer mes de lactancia, una función inmune reducida y una reducción en la fertilidad posterior (Roche et al., 2009).

La pérdida marcada de condición corporal entre los periodos secos y posteriores al parto se asocian a cambios desfavorables en la condición corporal durante la lactación temprana, lo que provoca aumento de la incidencia de enfermedades metabólicas y reproductivas posparto, la disminución de los niveles de colesterol total durante el primer mes de lactancia e intervalos más largos a la primera inseminación postparto en vacas Holstein (Kim y Suh, 2003).

La pérdida de CC se acompaña con una disminución en las concentraciones de leptina, lo cual es consistente ya que esta es sintetizada por los adipocitos y varía con

cambios en el porcentaje de depósitos grasos. La leptina inhibe el consumo y aumenta la tasa metabólica, por lo que se sugiere que esta disminución es estratégica para estimular el consumo de la vaca lechera posparto y para disminuir el consumo periférico de nutrientes (disminución de la tasa metabólica) (Delavaud et al., 2000).

Las vacas con baja CC al parto, o que sufren una pérdida excesiva de CC al comienzo del posparto, tienen menos probabilidades de ovular, hay menos vacas para la inseminación artificial, baja tasa de concepción al primer servicio, baja tasa de preñez de 6 semanas y también tienen una mayor probabilidad de pérdida de preñez y aumento del intervalo parto concepción (IPC) (Berry et al., 2007, Roche et al., 2009, Walsh et al., 2011).

Otro factor que agudiza aún más los efectos del BEN es el estrés calórico. Durante los períodos de estrés por calor, las vacas lactantes tienen un apetito reducido y una mayor pérdida de CC durante el posparto temprano en comparación con las vacas sin estrés calórico (Shehab-El-Deen et al., 2010).

Por lo tanto, se destaca la importancia de monitorear la puntuación de la condición corporal antes y después del parto como una ayuda para las decisiones nutricionales y de manejo con el fin de garantizar que ocurra un BEN leve, pero no severo, temprano en el posparto y para minimizar sus efectos de arrastre al resto de la preñez (Roche, 2006, Chagas et al., 2007).

2.5.4. Desórdenes metabólicos

Los cambios en el metabolismo de los tejidos/órganos del cuerpo aseguran la uniformidad del flujo de nutrientes en apoyo de la lactancia (Bauman y Currie, 1980). La partición de nutrientes es comandada por señales hormonales que en conjunto con los perfiles metabólicos pueden ser utilizados como herramientas predictivas del estado de salud de rodeo. En ese estado fisiológico las vacas lecheras de alta producción tienen una utilización de nutrientes por parte de la glándula mamaria superior a la del resto del cuerpo.

El inicio de la lactancia se asocia con un aumento de la hormona del crecimiento que impulsa la partición de nutrientes (principalmente en el hígado y el tejido adiposo) que respalda la producción de leche (Lucy, 2008). Debido al BEN, las concentraciones de insulina permanecen bajas, lo que evita un aumento de los receptores de la hormona de crecimiento del hígado y la secreción de IGF-I, lo que provoca el desacoplamiento del eje somatotrópico (Lucy, 2008). Esto afecta negativamente a la reproducción, ya que la insulina y el IGF-I no pueden actuar en sinergia con las gonadotropinas en las células ováricas, lo que impide que el folículo dominante ovule retrasando la reanudación de la ciclicidad (Beam and Butler, 1999).

Es en este período que se concentran las enfermedades metabólicas de la producción de leche actual. Del equilibrio con que la vaca resuelva este proceso dependerá la capacidad de maximizar la producción de leche, evitar enfermedades metabólicas y asegurar la siguiente preñez (Grummer, 1995).

Las vacas que sufren de trastornos metabólicos en el período periparto también tienen más probabilidades de tener una mayor incidencia de mastitis, cojera y endometritis (Roche, 2006), todo lo cual contribuye a reducir la eficiencia reproductiva (Walsh et al., 2011).

En la siguiente sección se detallan los metabolismos glucídico, lipídico y proteico y su influencia en la reproducción.

2.5.4.1. Metabolismo glucídico

La glucosa cumple un rol central en los procesos de crecimiento fetal y síntesis láctea, durante el último tercio de gestación y la lactancia temprana, existe un estímulo de la neoglucogénesis (NG) como respuesta al incremento de los requerimientos energéticos (Bell y Bauman, 1997).

En el posparto temprano, el hígado sufre amplias modificaciones bioquímicas y morfológicas para adaptarse al BEN. Esta estrategia adaptativa tiene un éxito notable en el mantenimiento de la glucosa en sangre; a pesar del gran aumento en la demanda, las concentraciones circulantes de glucosa generalmente solo muestran una breve caída alrededor de 1-2 semanas del momento del parto (Wathes et al., 2007c).

Muchas hormonas metabólicas y sus receptores también alteran su concentración durante este periodo crítico, con el fin de regular la síntesis de glucosa a nivel hepático como la insulina, el glucagón, la hormona de crecimiento (GH) (Bell y Bauman, 1997) y algunos glucocorticoides (Cirio y Tebot, 1998).

En particular, se producen cambios interdependientes en la vía de señalización de GH-insulina-IGF-I-glucosa (Lucy et al., 2001). Las demandas de nutrientes al final de la gestación se satisfacen en parte por un mayor estado de resistencia a la insulina en el tejido adiposo y el músculo, junto con una mayor sensibilidad a los agentes lipolíticos, que reducen la captación periférica de glucosa y facilitan el flujo de nutrientes desde las reservas maternas hacia la placenta (Bell, 1995, Wathes et al., 2007c).

La mayor demanda de glucosa después del parto a menudo conduce a una caída de la insulina circulante en la primera lactancia (Taylor et al., 2004, Walsh et al., 2008, Pereira et al., 2010b, Meikle et al., 2013). Se ha demostrado que mientras que los niveles de insulina aumentan luego del parto en vacas consumiendo dietas totalmente mezcladas (TMR), permanecen bajos en vacas en pastoreo (Meikle et al., 2013).

Resultados nacionales (Astessiano et al., 2012) demuestran que la expresión hepática de los transcritos de GHR-variante 1A e IGF-I disminuyeron del pre al posparto en vacas lecheras sobre pastoreo, pero en menor medida en vacas alimentadas con raciones totalmente mezcladas (TMR).

Se cree que el IGF-I es el principal mediador de la GH en la producción de leche, regulando la síntesis de leche por parte de la glándula mamaria. La mayor parte del IGF-I en la circulación se libera del hígado en respuesta al acoplamiento de la hormona del

crecimiento (GH) con los receptores de GH, y el IGF-I sistémico retroalimenta negativamente a la hipófisis para regular la liberación de GH (Lucy et al., 2001).

Durante BEN, sin embargo, el eje GH-IGF se desacopla debido a una regulación a la baja en el hígado GH-R y esto se asocia con una reducción en la circulación de IGF-I y concentraciones elevadas de GH (Lucy, 2001). Esto, junto con la baja insulina predominante, proporciona un entorno endocrino que promueve la acción directa de la GH sobre la lipólisis y la gluconeogénesis (Bell y Bauman, 1997, Lucy et al., 2001).

Este desacoplamiento significa que la relación entre las concentraciones de IGF-I y el rendimiento es inicialmente negativa en la lactancia temprana, mientras que más adelante en la lactancia, un aumento en el GH-R hepático restablece la relación positiva entre la GH y la producción de leche (Lucy et al., 2001, Wathes et al., 2007a).

En síntesis, en condiciones de subalimentación o bajos planos nutricionales la glicemia en sangre disminuye (Bjerre-Harpoth et al., 2012, Pires et al., 2015) y la importancia relativa de los precursores de la glucosa puede variar: en la medida que el propionato y el lactato provienen del alimento, la participación de estos decrece (Cirio y Tebot, 1998) y la utilización de glicerol y AA glucoformadores a nivel hepático se incrementa (Brockman, 1993).

Numerosas investigaciones científicas han demostrado que los mecanismos que regulan la distribución de energía y nutrientes en el sistema somatotrópico pueden afectar el sistema reproductivo en diferentes niveles del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Roche, 2006, Chagas et al., 2007) y los metabolitos que tienen más probabilidades de ejercer una función de señalización son la glucosa y la insulina. Las concentraciones bajas de insulina y glucosa posparto suprimen la secreción hipotalámica de GnRH y la subsiguiente liberación hipofisaria de LH (Diskin et al., 2003, Ohkura et al., 2004).

Debido a que la insulina estimula localmente el crecimiento folicular, la maduración y la esteroidogénesis, las concentraciones posparto reducidas están relacionadas con la disfunción ovárica (Gutiérrez-Aguilar, 1997, Landau et al., 2000, Armstrong et al., 2002, Butler et al., 2004, Vanholder et al., 2005a; Kawashima et al., 2007).

2.5.4.2. Metabolismo lipídico

Durante la lactancia temprana, la producción láctea (PL) pasa por una fase creciente hasta llegar a un pico de producción máxima, a su vez el consumo de materia seca (CMS) continúa siendo bajo, y por eso depende de la lipomovilización en lugar de una mayor ingesta (Knight, 2001).

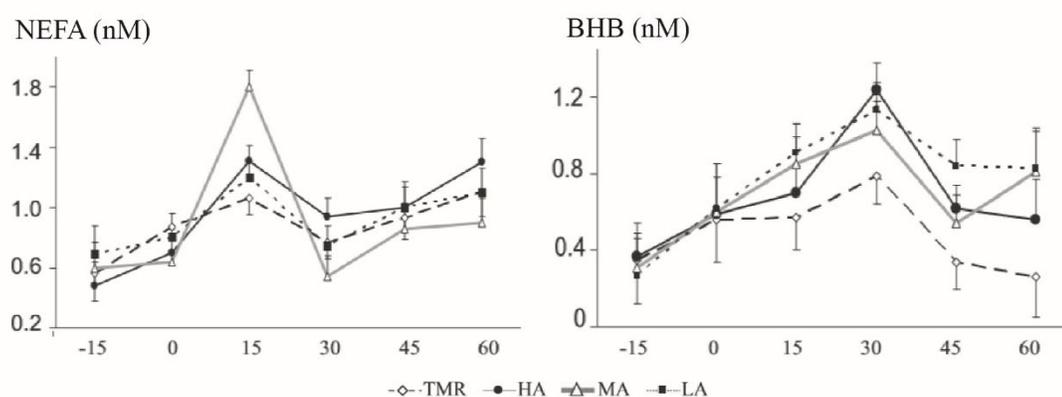
Durante el proceso de movilización los triacilglicéridos (TAG) se degradan a ácidos grasos no esterificados (NEFA) y glicerol. Los NEFA son absorbidos por el hígado, donde pueden oxidarse a dióxido de carbono para proporcionar energía u oxidarse parcialmente para producir cuerpos cetónicos o acetato que se transportan para su uso en otras partes del cuerpo. En consecuencia, durante las situaciones de BEN aumenta la concentración de NEFA en sangre (Kessel et al., 2008).

Alternativamente, los NEFAs pueden esterificarse a triacilglicéridos (TAGs) que se acumulan en el hígado, alcanzando su concentración máxima entre 7 y 13 días después del parto y luego disminuyendo gradualmente (Grummer, 1995, Bauman y Currie, 1980). El beta-hidroxibutirato (BHB) es la forma predominante de cuerpo cetónico en la sangre y su concentración es un índice de oxidación de ácidos grasos (Bell, 1995, Cirio y Tebot, 1998) y un indicador de estrés metabólico que supone el BEN (Gross et al., 2011, Bjerre-Harpoth et al., 2012).

De acuerdo con Cirio y Tebot (1998) los BHB pueden ser utilizados como sustratos energéticos o durante la lipogénesis en la glándula mamaria. La producción de los cuerpos cetónicos ocurre tanto en el rumen como en el hígado y en este último se realiza dentro de la mitocondria a partir del acetyl-CoA de manera que los NEFA son precursores importantes del BHB. Además, se ha señalado que el aumento de la concentración de la GH estimula la lipólisis (Bell y Bauman, 1997) y por lo tanto tiene una correlación positiva con los niveles de NEFA y BHB en sangre (Djoković et al., 2015).

Así mismo, como consecuencia de la movilización de reservas corporales, durante la lactancia temprana ocurre un incremento de la concentración plasmática de NEFA y posteriormente un aumento de la concentración de BHB (Lucy et al., 2001, Meikle et al., 2004, Pereira et al., 2010b, Jeong et al., 2015). Durante la lactancia media y tardía decrecen los niveles de ambos metabolitos (Piccioli-Cappelli et al., 2014) y se ha observado que la respuesta frente a una restricción nutricional es menor con el avance de la lactancia (Gross et al., 2011). Se ha demostrado que existe una correlación negativa entre la CC en el parto y la concentración de BHB y NEFA en el parto (Meikle et al., 2004, Petrer et al., 2015).

En el mismo sentido, las vacas que cursan la lactancia temprana consumiendo dietas con menor disponibilidad de nutrientes presentan mayores concentraciones de NEFA (Delaby et al., 2009, Ntallaris et al., 2017) y BHB (Meikle et al., 2013, Pires et al., 2015). No obstante, se ha observado que vacas que consumieron dietas TMR durante esta etapa no mostraron un incremento significativo en el nivel de BHB plasmático (Meikle et al., 2013) y que, en estrategias de alimentación fuertemente pastoriles, la concentración de NEFA y BHB puede estar influenciada –aunque débilmente– por el tipo de mezcla forrajera (Pembleton et al., 2016).



TMR: Dieta totalmente mezclada; HA: alta oferta de pastura (30kg/d); MA: oferta moderada de pastura (15kg/d); LA: baja oferta de pastura.

Figura 2. Concentraciones plasmáticas de NEFA y BHB en vacas multíparas entre - 15 y 60 días posparto.

Fuente: elaborado con base a Meikle et al. (2013).

A nivel ovárico, los NEFAs pueden afectar el crecimiento y desarrollo folicular al actuar directamente sobre las células foliculares. Adición de NEFA in vitro, en concentraciones medidas en líquido folicular (FF) durante BEN tiene efectos perjudiciales sobre la viabilidad y función de las células foliculares (Leroy et al., 2005b, Vanholder et al., 2005b, 2006).

Kruip y Kemp (1999) sugirieron posibles efectos tóxicos directos de altas concentraciones de NEFA a nivel ovárico. De hecho, en un modelo de maduración in vitro, los ácidos grasos de cadena larga saturados redujeron las tasas de maduración, fertilización, escisión y formación de blastocistos. La apoptosis, e incluso la necrosis de las células del cúmulo, durante la maduración podrían explicar estas observaciones (Leroy et al., 2005b).

Los genotipos de alta PL presentan mayores niveles de NEFA (asociado a una alta movilización de reservas) y BHB (en consecuencia, de BEN más pronunciados) durante la lactancia temprana (Pires et al., 2015, Petrera et al., 2015, Jorge-Smeding et al., 2021). En efecto, durante esta etapa, se han reportado mayores niveles de NEFA en la raza HF en comparación con N tanto en vacas primíparas (Reiche et al., 2015) como multíparas (Delaby et al., 2009, Jorge-Smeding et al., 2021). Análogamente, se ha observado mayor concentración de BHB en vacas HF en comparación con SR (Ntallaris et al., 2017).

2.5.4.3. Metabolismo proteico

Durante la lactancia temprana existe una movilización de reservas corporales que en situaciones nutricionales exigentes el balance de nitrógeno es negativo y por ende la disponibilidad de glucosa puede complementarse con un aumento del catabolismo de los aminoácidos almacenados en el músculo esquelético y otras proteínas tisulares, lo que aumenta la producción de urea, y el aporte AA tanto para la glándula mamaria como para la NG (Bell et al., 2000). Sin embargo, Bell et al. (2000) proponen que los requerimientos de AA para la NG provienen de la inhibición de la síntesis proteica más que de la movilización real de proteína muscular (Bell et al., 2000).

Si bien el déficit de energía puede estimular el catabolismo de los aminoácidos de las proteínas tisulares, lo que conduce a una mayor producción de urea (Bell, 1995), la mayor parte del amoníaco que ingresa el ciclo hepático de la urea proviene de la digestión microbiana de los alimentos, y por lo tanto se tiene que la concentración plasmática de urea es un indicador del contenido de nitrógeno de la dieta (Roseler et al., 1993, Baker et al., 1995) ya que al menos un 60% de la urea en sangre proviene del rumen (Cirio y Tebot, 1998). En este sentido, se ha reportado que la concentración de urea en sangre está afectada por la disponibilidad de forraje (Meikle et al., 2013) y por el plano nutricional (Delaby et al., 2009) de manera que los niveles de urea son más bajos en las situaciones más restrictivas.

En los sistemas lecheros donde las vacas son alimentadas con dietas ricas en proteínas para maximizar la producción de leche la urea se difunde en los fluidos corporales como la sangre y la leche y se equilibra en otras partes del cuerpo, incluyendo los tejidos reproductivos (Melendez et al., 2003), las concentraciones de urea en sangre a menudo fluctúan alrededor del parto (Wathes et al., 2007b) y el deterioro de la función

hepática durante el BEN, como suele ocurrir después del parto, reduce la tasa de eliminación (clearance) de urea (O'Callahan et al., 2001).

Diversos autores afirman que tanto las concentraciones de urea circulante altas como bajas, se han asociado con una reducción de la fertilidad en las vacas lecheras, en particular, un aumento del intervalo entre el parto y la concepción (Wathes et al., 2007c, Wathes et al., 2007b, Moore y Varga, 1996, Butler, 2001).

Si bien, los vínculos entre la fertilidad y el metabolismo de las proteínas aún no se han establecido de manera concluyente, varios autores proponen que el exceso de proteínas en la dieta disminuye el pH uterino o altera otros aspectos del ambiente uterino durante la fase lútea, lo que lo hace menos favorable para la supervivencia del embrión (Elrod et al., 1993, Rhoads et al., 2004, McEvoy, 1997, Gunaretnam et al., 2013).

Algunos estudios señalan que la urea en sangre está afectada por la raza (Delaby et al., 2009, Reiche et al., 2015, Jorge-Smeding et al., 2021) observándose que los animales seleccionados para alta PL presentan una mayor concentración plasmática.

2.5.5. Reinicio de la ciclicidad

En Uruguay las vacas llegan al parto manteniendo la CC con el que fueron secadas o inclusive, perdiendo CC, llegando en balance energético negativo (BEN) al parto, hipotecando producción de leche y retrasando el reinicio de la ciclicidad posparto (Meikle et al., 2004).

Una vaca lechera posparto 'normal' se puede definir como aquella que ha resuelto la involución uterina, ha reanudado el desarrollo folicular ovárico, ovuló un folículo dominante saludable en el posparto temprano y mantiene ciclos estrales normales a intervalos regulares de aproximadamente 21 días, junto con concentraciones homeostáticas de insulina, IGF-I y glucosa (Roche, 2006).

Sin embargo, hasta el 50 % de las vacas lecheras modernas tienen ciclos estrales anormales después del parto, lo que aumenta el intervalo parto concepción (IPC) (Opsomer et al., 1998), siendo este, el factor limitante a nivel nacional, al momento de

cumplir con el requisito previo para un sistema lechero rentable que es producir un ternero a intervalos regulares (Royal et al., 2002, Meikle et al., 2013).

En Uruguay, estudios en 200 mil lactancias indicaron que el IPC aumentó de 131 a 150 días de 1997-2001 a 2001-2005 (Rovere et al., 2007). Esto indica que la situación nacional actual, donde la presión por selección para producción de leche ha afectado los índices reproductivos, no escapa a lo que ocurre a nivel mundial (Gutierrez et al., 2006).

Es probable que el restablecimiento más temprano de la función ovárica resulte en más ciclos antes del período de servicio y se ha asociado positivamente con una mejor concepción (Thatcher y Wilcox, 1973, Butler y Smith, 1989).

Después del parto, ocurre una ola de desarrollo folicular en 5 a 7 días independientemente de BEN y en respuesta a una elevación en las concentraciones plasmáticas de la hormona foliculo estimulante (FSH) (Butler, 2000). El inicio de una onda folicular y la formación de un gran folículo dominante durante BEN no parece ser una limitación para la primera ovulación. Sin embargo, se han descrito tres resultados del desarrollo folicular (Beam y Butler, 1999). (1) Ovulación del primer folículo dominante 16–20 días después del parto; (2) No ovulación del primer folículo dominante seguido de atresia folicular e inicio de una nueva onda folicular; (3) El folículo dominante no ovula y se vuelve quístico. El desarrollo de folículos quísticos o dominantes no ovulatorios prolonga el intervalo para la primera ovulación a 40 o 50 días después del parto. La ovulación de un folículo dominante durante la lactancia temprana depende del restablecimiento de la secreción pulsátil de LH conducente al crecimiento folicular preovulatorio y la producción de estradiol (Butler, 2000, Diskin et al., 2003, Crowe, 2008).

Sin embargo, un CMS bajo junto con BEN severo durante este período suprime la secreción pulsátil de hormona luteinizante (LH), reduce la respuesta ovárica a la estimulación de LH (Butler, 2000) y también reduce la competencia funcional del folículo caracterizada por una producción reducida de estradiol (Diskin et al., 2003) y, en última instancia, provoca un retraso en la ovulación (Butler, 2003).

Los animales estresados por el calor también pueden tener una amplitud y frecuencia de pulso de LH bajas, concentraciones bajas de estradiol y folículos dominantes más pequeños que pueden extender el intervalo desde el parto hasta la primera ovulación (De Rensis y Scaramuzzi, 2003).

En conclusión, los factores de manejo que estimulan la reanudación temprana de la ovulación, lo que conduce a una serie de ciclos estrales antes de la inseminación, darán

como resultado que más vacas queden preñadas, que vacas mal manejadas que tienen períodos prolongados de anestros posparto (Walsh et al., 2011).

Otros factores de riesgo citados para la reanudación tardía de la ciclicidad incluyen trastornos en el parto, estación del parto, manejo, mastitis y cojera (Crowe, 2008, Garnsworthy et al., 2008). En vacas mastíticas y cojas, un retraso en la reanudación de la ciclicidad podría agregar 7 y 17 días adicionales, respectivamente, al intervalo entre el parto y la concepción (Dobson et al., 2008).

2.6. FACTORES QUE AFECTAN LA FERTILIDAD DURANTE LA ÉPOCA REPRODUCTIVA

Para obtener un intervalo entre partos de 365 días, la temporada de inseminación debe comenzar 60 días después del parto y la vaca debe concebir a los 83 días después del parto, suponiendo una duración de gestación de 282 días. La vaca lechera tiene que estar en condiciones óptimas para ser servida. Esto incluye la involución uterina, la recuperación de BEN y el establecimiento de ciclos estrales normales (Walsh et al., 2011).

2.6.1. Comportamiento estral

Hasta el 50 % de las vacas lecheras modernas tienen ciclos estrales anormales después del parto, lo que aumenta el intervalo entre el parto y el primer servicio (Opsomer et al., 1998) y disminuye las tasas de concepción (Garnsworthy et al., 2009).

Los ciclos estrales normales en las vacas junto con signos evidentes de estro son esenciales para que la inseminación pueda ocurrir en el momento adecuado en relación con la ovulación. Sin embargo, el porcentaje de animales en estro que están en pie para montar ha disminuido del 80% al 50% y la duración del estro detectado se ha reducido de 15 a 5 horas en los últimos 50 años (Dobson et al., 2008).

La mala expresión y la incapacidad para detectar fácilmente el estro dificultan aún más la inseminación en el momento correcto. Diferentes métodos de detección del estro producen diferentes eficiencias de detección (Roelofs et al., 2010). La eficiencia en la detección de celo sigue siendo una de las mayores limitantes para el éxito reproductivo

en tambos (Mottram, 2016). Según datos de la encuesta lechera 2019, el 43% de los establecimientos lecheros utiliza el método de parche o pintura para esto (INALE. MGAP, 2019).

Los factores de riesgo para la expresión deficiente del estro se clasifican como factores ambientales o de la vaca, donde los factores de la vaca incluyen anestro silencioso o anovulatorio, parto, producción de leche y salud, y los factores ambientales incluyen nutrición, alojamiento, estación y número de animales sexualmente activos (Roelofs et al., 2010).

Estudios demuestran que la duración del celo y la actividad durante el mismo decrecen a medida que aumenta la producción de leche, por ello el comportamiento de celo es más difícil de registrar en vacas lecheras de alta producción (Lucy, 2009). Un aumento de un kilo en la producción de leche se asocia con una disminución de 1,6% en los cambios de actividad en vacas en estro (López et al., 2004).

Wiltbank et al. (2006) sugieren que el elevado metabolismo de las vacas lecheras de alta producción puede comprometer el folículo preovulatorio o puede llevar al rápido metabolismo del estradiol en sangre y así reducir la expresión del celo.

En los sistemas modernos de producción lechera, la incidencia de cojera puede oscilar entre el 2 y el 20 % (Bergsten, 2001) y ocurre con mayor frecuencia en los primeros 60 a 90 días de lactancia (Rowlands et al., 1985). Un estudio reportó una reducción general de aproximadamente 37% en intensidad de celo para vacas cojas. El número de montas recibidas en vacas con laminitis disminuye hasta en un 70% (Lucy, 2009).

2.6.2. Mortalidad embrionaria

La mortalidad embrionaria es una de las principales causas de fracaso reproductivo. Según el Comité de Nomenclatura Reproductiva Bovina (1972), la mortalidad embrionaria temprana ocurre entre la fecundación y el día 24 de gestación, la mortalidad embrionaria tardía ocurre entre los días 25 y 45, etapa en la que se completa la diferenciación embrionaria, mientras que la mortalidad fetal ocurre después de esta y hasta el parto.

Un estudio realizado por Ayalon en 1978 afirma que la mayoría de las pérdidas ocurren antes de los 15 días después del servicio, teoría que fue reafirmada por diversos autores a lo largo del tiempo (Diskin y Morris, 2008) Sin embargo, el momento de la pérdida embrionaria temprana no es consistente entre los estudios. Algunos estudios informan que la mayor pérdida de embriones ocurre dentro de la primera semana posterior a la concepción (Sartori et al., 2002), mientras que otros estudios sugieren que ocurre dentro de la segunda semana posterior a la concepción (Diskin y Sreenan, 1980).

Walsh et al. (2011) considera la mortalidad embrionaria en tres periodos; mortalidad muy precoz entre los días 0 y 7, mortalidad precoz entre los días 7 y 24 y mortalidad embrionaria tardía entre los días 24 y 45 (siendo la mortalidad fetal a partir del día 45).

Las causas de la mortalidad embrionaria muy temprana se centran en la incapacidad de desarrollo de los embriones tempranos como consecuencia de la mala calidad de los ovocitos o de un ambiente uterino inadecuado (Walsh et al., 2011).

El embrión permanece en el oviducto durante 4 a 5 días después de la ovulación antes de viajar al útero. El oviducto proporciona nutrientes (iones, aminoácidos y glucosa) y factores de crecimiento locales (IGF-I e IGF-II) al cigoto en desarrollo (Robinson et al., 2008) que pueden ser modificados por la nutrición materna (McGuire et al., 1992, Pushpakumara et al., 2002), balance de energía (Fenwick et al., 2008) y lactancia (Leroy et al., 2005a, Sartori et al., 2010).

El estado fisiológico (lactancia o no lactancia) tiene un efecto significativo en la calidad del embrión. Los embriones recuperados entre los días 5 y 7 de vacas Holstein-Friesian no lactantes fueron de mayor calidad en comparación con las vacas Holstein-Friesian lactantes (Leroy et al., 2005a, Sartori et al., 2010).

Por otra parte, Thatcher et al. (1995) afirma una relación entre los bajos niveles de progesterona materna y la pérdida embrionaria temprana. La insuficiente producción de progesterona para sustentar el desarrollo del embrión se asocia con una escasa producción de interferón tau y una falla en el sistema de reconocimiento materno de la preñez. Esta representa hasta el 25% de las fallas de concepción en las vacas lecheras (Sreenan y Diskin, 1983). Concentraciones incrementadas de progesterona han sido asociadas con un incremento de la tasa de desarrollo del conceptus en el momento del reconocimiento materno de la preñez (Garrett et al., 1988, Lonergan, 2010).

Aunque el grado de mortalidad embrionaria tardía y fetal temprana es relativamente bajo en comparación con las pérdidas observadas dentro de los 24 días posteriores a la inseminación, presenta pérdidas financieras y dificultades de gestión para el productor lechero (Walsh et al., 2011).

2.7. GESTACIÓN Y HORMONAS DE LA GESTACIÓN

La gestación comienza con la unión del ovocito y el espermatozoide en la ampolla del oviducto materno y su duración es en promedio 283 días (243-316 días) variando según factores genéticos, ambientales, maternos o fetales³.

Luego de la fertilización, el cigoto (una célula) sufre una serie de divisiones mitóticas dando lugar a la formación de numerosas células denominadas blastómeros. Una vez formados de 8 a 16 blastómeros, el embrión es denominado mórula (Valadão et al., 2019). Los primeros 42 días de gestación se denomina periodo embrionario, del día 43 en adelante se lo reconoce como período fetal (Comité de Nomenclatura Reproductiva Bovina, 1972). En esta primera etapa se produce la formación del cigoto, la implantación del embrión, el inicio de la adhesión trofoectodérmica al endometrio y culmina cuando se produce el inicio de la mineralización ósea fetal.

Luego los blastómeros se reorganizan y producen un fluido formando una cavidad denominada blastocele o embrioblasto, el embrión se divide en dos poblaciones celulares distintas, la masa celular interna y una capa de células únicas denominada trofoblasto. La masa celular interna dará lugar al cuerpo del embrión y las células trofoblásticas darán lugar al corion. El embrioblasto (masa de células internas), se convertirá en las tres capas principales del embrión (ectodermo, mesodermo y endodermo) durante el proceso de gastrulación. Las células trofoblásticas producen enzimas proteolíticas que debilitan la zona pelúcida para que se rompa fácilmente a medida que continúa el crecimiento del blastocisto (Senger, 2003).

³ Bartolomé, J. 2009. Com. personal.

Cuando el blastocele se vuelve muy grande, el embrión se expande, lo que adelgaza la zona pelúcida. Esta es la etapa de blastocisto expandido. Y cuando la expansión es tan grande, el embrión sale de la zona pelúcida y da lugar al blastocisto eclosionado que flota dentro del útero durante 4-5 día post fertilización (Senger, 2003).

El embrión desciende al útero entre los días 5 y 7 después del servicio (Wiebold, 1988). Durante este tiempo hasta el día 15, el embrión forma un blastocito que se desarrolla en un concepto filamentoso alargado y ocupa el cuerno uterino. El desafío en esta etapa es producir concentraciones adecuadas de interferón tau para señalar el reconocimiento materno de la gestación e inhibir la liberación de prostaglandina luteolítica F2 α del útero (Spencer et al., 2008).

La concentración de progesterona es crítica para el desarrollo y supervivencia embrionaria temprana (Roche, 2006) y las bajas concentraciones de esta hormona e IGF-1 pueden crear un microambiente uterino subóptimo que no permite el desarrollo embrionario temprano (Leroy et al., 2008a). Se ha observado en vacas lecheras de alta producción un mayor flujo de sangre y un aumento en el metabolismo hepático, lo cual podría explicar una mayor tasa de metabolización de la progesterona (Hernández-Cerón, 2017).

La fijación de la placenta en los rumiantes se caracteriza por la presencia de células binucleadas que están presentes durante toda la gestación. Con la continua expansión de la placenta en el útero, la adhesión microvellosa entre el corion y el epitelio uterino se vuelve más compleja para dar lugar a miles de estructuras microcotiledonarias que mantienen la placenta firmemente en su lugar. Este proceso de desarrollo embrionario está regulado por la progesterona producida por el cuerpo lúteo, responsable del ambiente uterino. Dicha secreción de progesterona estimula la producción de líquido endometrial, también conocido como “leche uterina”, sustancia que se encarga de mantener y nutrir al embrión hasta la formación de los placentomas. La progesterona originada por el cuerpo lúteo es la responsable de mantener la gestación hasta el día 150 aproximadamente, de aquí en adelante se encargará la progesterona de origen placentario⁴.

El placentoma (punto de interfaz) en la placenta cotiledonaria consiste en un cotiledón fetal aportado por el corion y una carúncula materna. Aproximadamente el día

⁴ Bartolomé, J. 2009. Com. personal.

25 el corion inicia la unión a las carúnculas del útero y para el día 40 el contacto está bien establecido (Senger, 2003).

Una vez que se finalizó la formación de órganos y sistemas del embrión a partir de las tres capas germinales formadas en la gastrulación, se da el proceso de deposición de calcio en los huesos, y el embrión toma la forma característica de su especie; es aquí cuando comienza a ser llamado feto (Sanín et al., 2014).

Mientras que el blastocito y el embrión joven son nutridos por el líquido endometrial, el feto recibe su aporte de nutrimentos de la circulación materna a través de la placenta (Senger, 2003).

2.7.1. Función endocrina de la placenta

El tejido placentario además de presentar entre sus funciones el transporte de nutrientes, eliminación de desechos y la respiración, es un órgano endócrino capaz de sintetizar en cantidades variables, factores de crecimiento y varias hormonas; esteroideas y proteicas (Clerget et al., 2008).

Las hormonas proteicas secretadas por la placenta comprenden dos familias, la familia de los genes GH/PRL que incluyen el lactógeno placentario (PL), las proteínas relacionadas con la prolactina, proteínas con acción similar a la prolactina, la hormona de crecimiento placentaria (GH-P) y la familia de las proteínas placentarias asociadas a la gestación de rumiantes (PAG), también llamadas proteína B específicas de la gestación (PSPB). Estas últimas presentan un rol relevante en el reconocimiento, mantenimiento y correcto desarrollo de la preñez (Clerget et al., 2008).

De las hormonas nombradas se describirá a continuación las características químicas y biológicas de las PAG, objeto de estudio en este trabajo.

2.7.2. Proteínas asociadas a la gestación (PAGs)

Como se mencionó anteriormente, la placenta está conformada por carúnculas y cotiledones que juntos forman los placentomas, la unidad de comunicación materno fetal (Aquad et al., 2019, Hernández-Cerón, 2017).

Estrechamente fusionado al tejido materno, cubriendo las áreas cotiledonarias e intercotiledonarias se encuentra una capa unicelular denominada trofoblasto (Touzard et al., 2013), la que tiene como principal función, facilitar la implantación del embrión al endometrio y proveerlo de nutrientes.

Según Wathes y Wooding (1980) el trofoblasto está constituido por dos tipos de células diferentes, las células mononucleares que ocupan el 80% del mismo y las células binucleadas que ocupan el 20% restante (Wathes y Wooding, 1980).

Dentro de las células binucleadas del trofoblasto existen gránulos secretores de las Proteínas Asociadas a la Gestación (PAGs, figura 3), (Wooding et al., 2005, Xie et al., 1991, Zoli et al., 1992) un conjunto de proteínas que serán entregadas al tejido conectivo materno y algunas llegarán al torrente sanguíneo (Wallace et al., 2015) entre la semana 3-4 de gestación (Shahin et al., 2014).

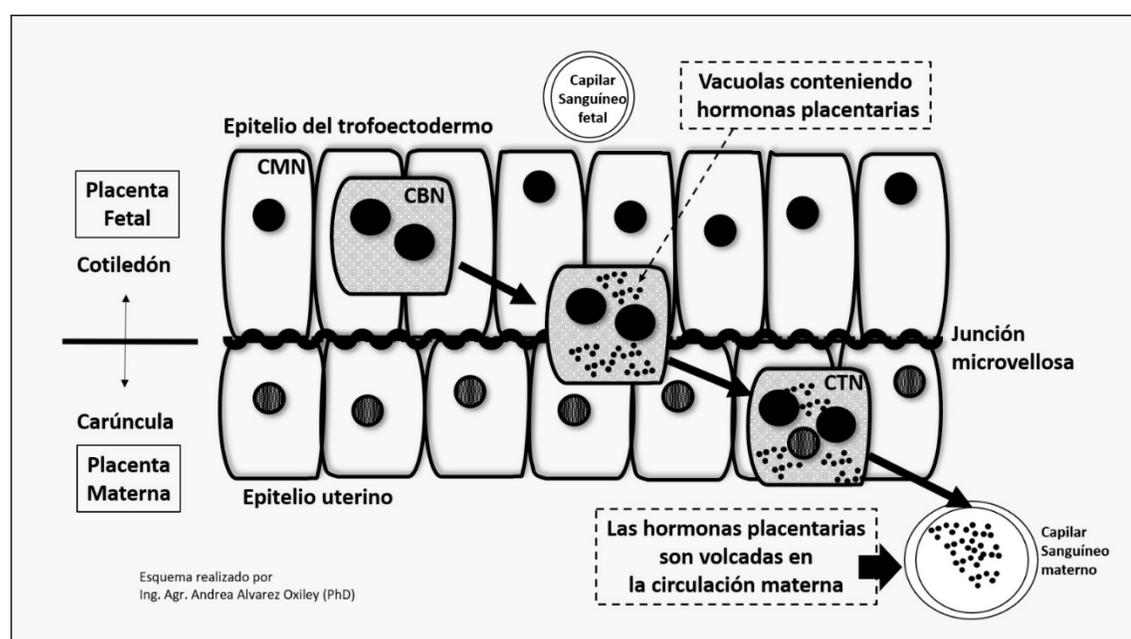


Figura 3. Representación esquemática de la migración de las células binucleadas desde el trofoectodermo hasta su fusión con las células del endometrio uterino.

Fuente: adaptado de Senger (2003).

En 1982, Butler et al. aislaron a partir de placenta bovina, dos proteínas específicas de la gestación, a las cuales llamaron proteínas específicas de la gestación A y B (PSPA y PSPB). Estudios posteriores revelaron que la PSPA era idéntica a la alfa-feto

proteína (AFP), una proteína sintetizada en el hígado fetal. Por el contrario, la PSPB no fue caracterizada al momento de su identificación, sin embargo, se demostró rápidamente que esta glicoproteína se encontraba presente en la circulación periférica materna y que su cuantificación permitiría diagnosticar la gestación en hembras de las especies ruminantes de mayor interés para la producción animal.

Otros equipos de investigación se interesaron en el uso de las proteínas placentarias para el diagnóstico y seguimiento de la gestación, como el caso de la PAG (Zoli et al., 1991) y de la PSP-60 (Mialon et al., 1993).

Hughes et al. (2000) a partir de análisis filogenéticos identificaron dos grupos bien diferentes en lo que refiere a su origen y localización. Definieron como " PAGs antiguas" a las que se originaron hace aproximadamente 87 millones de años y " PAGs modernas" a las que surgieron hace 52 millones de años (Hughes et al., 2000).

Telugu et al. (2009) afirman que la mayoría de las PAGs pertenecen al grupo moderno, dicho grupo se encuentra ampliamente representado en los bóvidos, como el ganado vacuno y ovino (Telugu et al., 2009).

Conforme un estudio realizado por Touzard et al. (2013), se encontró que las PAGs antiguas son secretadas por las células intercotiledonarias mientras que las PAGs modernas son secretadas por las células cotiledonarias (Touzard et al., 2013).

El grupo localizado en la interfaz placentaria fetomaternal, se considera de origen antiguo y ha sido designado PAG-2; a su vez un subgrupo expresado principalmente en el citoplasma de células binucleadas trofoblásticas, ha sido designado PAG-1 (Wallace et al., 2015).

Una característica del tejido placentario es que induce una glicosilación típica en las proteínas; debido a que las PAG tienen múltiples sitios potenciales de N-glicosilación; el nivel de glicosilación "efectiva" afectara su masa molecular que variara entre 55000 y 70000 Da. Es por ello que también son denominadas PSP de 60000 Dalton de peso molecular (PSP 60) (Klisch et al., 2005).

De acuerdo con Clerget et al. (2008), el nivel de glicosilación es una característica importante debido a que confiere mayor vida media (que va de horas a días) y estabilidad de la hormona en la sangre materna (Clerget et al., 2008).

Además de su uso como herramienta de diagnóstico de gestación, la cuantificación de la PAG puede brindar información relevante para las líneas de investigación que abordan el estudio de las pérdidas embrionarias y muertes fetales, así como estudios de biotecnología embrionaria relacionados con la transferencia de embriones (TE), clonaje y fertilización in vitro y fisiológicos con foco en la nutrición animal (Perry et al., 2021).

2.7.3. Concentración de PAG durante el curso normal de la gestación

En las vacas gestantes, las concentraciones de PAG son detectables en la circulación materna a partir del día 18 – 20 post concepción, llegando a concentraciones de 3 a 6 mg/ml en torno a los 30 a 35 días de gestación (Perényi et al., 2002). Sin embargo, la concentración de la PAG presenta una gran variación inter-individual. Desde un punto de vista práctico, significa que esta proteína es detectable en la circulación materna de alrededor de 98% de las hembras gestantes a partir del día 28 de gestación (Zoli et al., 1992).

Durante la gestación, las concentraciones de PAG se elevan progresivamente entre la semana 6 y 35 (4 ng/ml a 159 ng/ml) para luego aumentar rápidamente entre la semana 35 y la última semana de gestación (concentración en el orden de 1550 ± 590 ng/ml). Los valores máximos son alcanzados 1 a 5 días antes del parto (2462 ± 1018 ng/ml) (Figura 4).

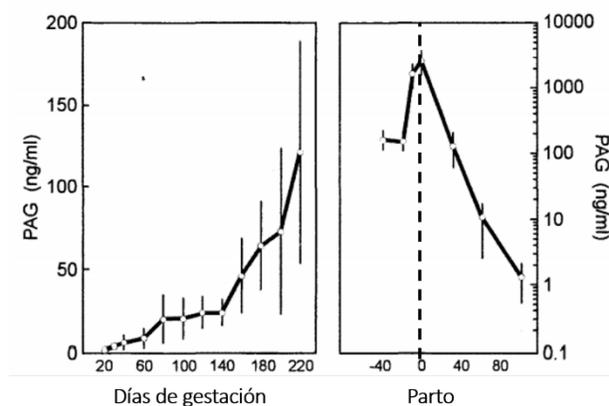


Figura 4. Perfiles plasmáticos de PAG (media \pm SD) en vacas gestantes

Fuente: tomado de Zoli et al. (1992).

Después del parto, las concentraciones séricas de PAG disminuyen progresivamente hasta el día 80 - 120 alcanzando valores por debajo del límite de detección (0,2 ng/ml) mediante cuantificación por RIA (Zoli et al., 1992). Durante este período, la determinación de PAG como herramienta de diagnóstico de gestación no es factible de hacerse a condición que el intervalo parto – IA/entore sea superior a 60 días.

El período necesario para que la PAG se vuelva indetectable en la circulación materna está relacionado a una larga vida media de esta hormona glicoproteica, la cual ha sido estimada en 9 días en las vacas de razas europeas (Kiracofe et al., 1993) y de 10 días en las razas zebuinas pertenecientes a la raza Azawak (Sousa et al., 2003).

Así mismo, se ha observado que las concentraciones de PAG son mayores en la circulación materna que en la fetal, este hecho podría sugerir que la PAG es volcada prioritariamente en la circulación materna que en la fetal (Zoli et al., 1992).

2.7.4. Factores que pueden influenciar las concentraciones maternas de PAG

Un ensayo experimental realizado por Lopez-Gatius et al. (2007) en vacas lecheras de la raza Holstein Friesian, reportó la interacción entre la producción de leche y la concentración de PAG. La concentración de esta hormona decrece al incrementarse la producción de leche, mientras que la progesterona permanece invariable. Estos autores sugieren que la disminución de PAG pueda estar asociada a un aumento del tráfico de esta hormona hacia la glándula mamaria o a un aumento de la tasa de depuración (clearance) debido a una mayor actividad metabólica asociada a la producción láctea.

Un estudio realizado en vacas receptoras de la raza Holstein (multíparas y primíparas) y Hereford (multíparas) a las cuales se les transfirió embriones Holstein, permitió poner en evidencia la influencia de la raza de la receptora y del sexo del feto sobre la concentración periférica de PAG. Dicho estudio, reporta que las concentraciones medias de PAG en torno al parto (días -20 a día 2; día 0, parto) han sido significativamente más elevadas en vacas Hereford multíparas (3500 ng/ml) que en las vacas primíparas (2300 ng/ml) y las vacas multíparas Holstein (1500 ng/ml). Así mismo, las vacas receptoras Holstein portadoras de fetos machos presentaron concentraciones de PAG más elevadas que aquellas vacas portadoras de fetos hembra (Zoli et al., 1992). De la misma forma, se ha reportado la relación entre las concentraciones de PAG durante la gestación y el tipo de gestación (simple o múltiple) así como el peso del ternero al nacimiento (Patel et al., 1997).

Así mismo, Szenci et al. (1998) han reportado la caída de las concentraciones de PAG como consecuencia de las pérdidas embrionarias y abortos. Estos investigadores proponen que además del diagnóstico de gestación precoz, la PAG puede contribuir a esclarecer las pérdidas embrio-fetales permitiendo realizar un seguimiento de la gestación.

Sousa et al. (2003) reportaron que la concentración de PAG puede ser modificada por las condiciones ambientales tales como el estatus nutricional de la madre. Un ensayo realizado con vacas zebuinas Azawak permitió poner en evidencia el aumento de las concentraciones de PAG en vacas con una muy baja condición corporal.

3. HIPOTESIS

En un sistema pastoril con bajo uso de insumos, la vaca Normando es mas equilibrada en cuanto a producción y reproducción, lo que se ve reflejado en la dinámica de secreción de la PAG. A su vez, el mayor metabolismo de las vacas HF asociado a mayor producción redundo en una menor secreción de PAG.

4. OBJETIVOS

4.1.1. Objetivo general

Determinar la dinámica de secreción de la proteína asociada a la gestación (PAG) durante un ciclo productivo en vacas lecheras HF y doble propósito Normando (N), en un sistema de producción lechera de base pastoril y poca incidencia de suplementos externos (SPBI).

4.1.2. Objetivos específicos

Establecer un modelo matemático de carácter exploratorio que explique la dinámica de secreción de PAG a lo largo del ciclo productivo.

Determinar las correlaciones (r) entre la PAG y características de la producción lechera (peso vivo (PV), peso del utero (PU), condición corporal (CC), producción de leche (PL) y composición de solidos de la leche). Tambien entre la PAG y metabolitos sanguíneos (urea, glucosa, NEFA).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. LOCALIZACIÓN Y DISEÑO EXPERIMENTAL

El experimento se llevó a cabo en la Estación Experimental Bernardo Rossengurtt de la Facultad Agronomía (UdelaR) situada en la ruta 26, km. 408 (32°21' S, 54°26' O), departamento de Cerro Largo, Uruguay.

Para el presente trabajo se seleccionaron 12 vacas lecheras multíparas de raza Normando (n = 6) y Holstein Friesian (n = 6) que formaban parte de un estudio más amplio que involucro 27 animales en total (14 HF, 13 N) con partos de otoño (HF: 4/4/2016 ± 12,9 días; N: 20/4/2016 ± 9,9 días) según lo reportado por Jorge-Smeding et al. (2021). El manejo reproductivo para sincronizar los partos consistió con dos dosis de prostaglandina con un intervalo de 8 días. Se realizó la detección de celo (desde las 36 h post 2da dosis de PG) e inseminación, y posteriormente se realizó repaso con toros.

Las 12 vacas utilizadas en esta tesis fueron seleccionadas de acuerdo a su fecha de concepción que fue el 15/07/2016 ± 13 días (HF: 15/07/2012 ± 15 días; N: 16/07/2016 ± 11 días; media ± ES). Al momento del parto, las 12 vacas seleccionadas tuvieron un PV de 589 ± 17,2 kg y 616 ± 17,2 kg para cada raza respectivamente, y una condición corporal 2,54 ± 0,098 kg y 2,97 ± 0,098 kg. A su vez, durante la lactancia de 2016, la producción de leche (PL) fue de 17,2 ± 0,76 kg y 13 ± 0,76 kg.

A partir del segundo día postparto fueron manejadas en un solo lote en conjunto con el resto de las vacas en ordeño del tambo y permanecieron en condiciones de cielo abierto durante todo el experimento. Las vacas fueron secadas el 24/2/2017 o cuando la PL fuera igual o menor a 4 L/día. Los ordeños se realizaron diariamente a las 7.30 y 16.30 h.

5.2. CONDICIONES CLIMÁTICAS DURANTE EL EXPERIMENTO Y DIETA DE LOS ANIMALES

Los registros climáticos fueron obtenidos de la estación meteorológica de Melo

del Instituto Uruguayo de Meteorología (INUMET, 2017)⁵. Como evento meteorológico por fuera de la media histórica, se destaca las altas precipitaciones acumuladas para el mes de abril cuando se alcanzaron 445 mm.

En relación a la dieta, en el preparto pastorearon campo natural y se les ofreció cantidades crecientes de afrechillo de arroz hasta alcanzar 8 kg MF/vaca/día. Durante la lactancia las vacas pastorearon pasturas sembradas (verdeo de invierno, verdeo de verano, praderas permanentes). A su vez, de acuerdo a la disponibilidad de pasturas y condiciones climáticas el pastoreo se suplemento con reservas forrajeras (ensilaje de sorgo de planta entera, heno de moha, heno de pradera) y concentrado (afrechillo de arroz) cuyas ofertas variaron de acuerdo a la disponibilidad de pasturas, estado fisiológico de las vacas y aptitud climática para el pastoreo. El afrechillo se ofreció en cada ordeño dentro de la sala y el forraje conservado en un potrero destinado a tales efectos. En el período seco las vacas pastorearon sorgo forrajero (Jorge-Smeding et al., 2021). En la figura 5 se aprecia una representación esquemática de la dieta ofrecida a las vacas durante el experimento. La composición detallada de la dieta está disponible en anexos (Tabla 1).

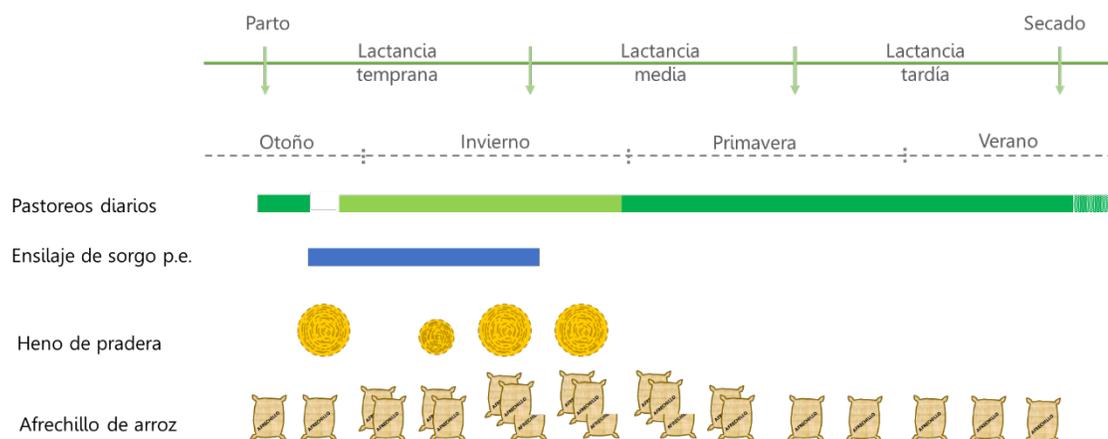


Figura 5. Esquema gráfico de la estrategia de alimentación.

Fuente: elaborado con base en Jorge-Smeding et al. (2021).

Los turnos diarios de pastoreo se representan con la barra de tonos de verde (verde intenso: 2 pastoreos/d; verde claro: 1 pastoreo/d; blanco: 0 pastoreo/d; verde texturizado: pastoreo continuo de campo natural). La oferta de reservas y concentrado se representan con barras e iconos.

⁵ INUMET, 2007. Com. personal.

5.3.MEDICIONES Y MUESTREOS

El PV y la CC se determinaron mensualmente entre los -11 y los 326 días post parto (DPP). El PV fue corregido por peso de útero grávido según Ferrell et al. (1976) y la CC se determinó con escala de 1 a 5 con 0.25 punto de precisión (Edmonson et al., 1989).

Desde los 24 DPP y hasta el momento del secado se midió mensualmente la PL individual utilizando medidores Waikato® y se tomaron muestras de leche de 60 ml. Dichas muestras fueron refrigeradas a 5 °C con conservante Bronopol® y enviadas al laboratorio COLAVECO (Colonia) para determinar la concentración de sólidos. En coincidencia con las determinaciones de PV y CC se extrajeron muestras de 10 mL de sangre de la vena coccígea utilizando tubos vacutainer® heparinizados. La sangre fue centrifugada a 3000 xg y el plasma almacenado a -20 °C hasta el momento de los análisis bioquímicos. En función de los datos de composición, se calculó la leche corregida por grasa y proteína (PLCGP) según lo descrito por Jorge-Smeding et al. (2021).

La determinación de PAG (n = 12) se realizó mediante un kit de ELISA indirecto comercial IDEXX (IDEXX Laboratories, Westbrook). Este kit es un método cualitativo cuyo resultado se expresa en absorbancia (Abs). Teniendo en cuenta que Zoli et al. (1992) establece mediante la técnica de RIA que la concentración de PAG para diagnosticar un animal gestante debe ser $\geq 0,5$ ng/ml; se propone realizar una comparación entre dicho valor y el valor de Abs ($\geq 0,3$) que establece el kit IDEXX para identificar las vacas gestantes. Cabe destacar que el kit IDEXX establece un límite superior de detección de 3,8 de densidad óptica por lo que la comparación propuesta solo tiene carácter exploratorio.

5.3.1. Principio de la técnica de ELISA tipo sándwich y cálculo de la concentración de PAG.

La determinación de la PAG se realizó mediante la técnica de ELISA tipo sándwich. Esta técnica consiste en la puesta en evidencia del antígeno, en nuestro caso la PAG, mediante la captura de la hormona en forma indirecta. La PAG contenida en la muestra se unirá a los anticuerpos que se encuentran adheridos a los pocillos de la placa. Un segundo anticuerpo detector, contenido en una solución, es agregado a los pocillos. El anticuerpo detector, se une a los complejos antígeno-anticuerpo ya formados. Por último, se agrega un conjugado que se unirá al anticuerpo detector, lo cual provocará una reacción de viraje de color que detectará indirectamente la PAG. En la siguiente imagen se muestran en forma esquemática dicho procedimiento.

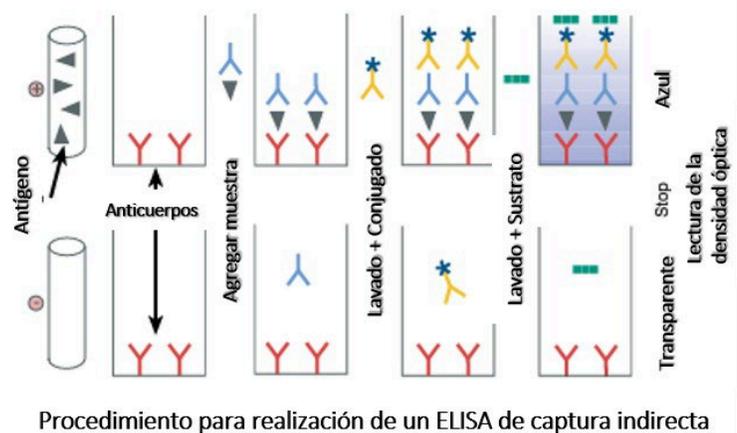


Figura 6. Esquema de la técnica de ELISA tipo sándwich.

Fuente: adaptado de IDEXX (2019).

Cálculos para la determinación de la concentración de la PAG de las muestras, medida como valor de absorbancia:

Controles

$$CN\bar{x} = \frac{CN1 A(450-REF) + CN2 A(450-REF)}{2}$$

$$CP\bar{x} = \frac{CP1 A(450-REF) + CP2 A(450-REF)}{2}$$

Criterios de Validación

$$CP\bar{x} - CN\bar{x} \geq 0,300 \quad CN\bar{x} \leq 0,150$$

Muestras

$$M-N = \text{muestra } A(450-REF) - NC\bar{x}$$

Interpretación

Vacías: $M-N < 0,300$

Gestante: $M-N \geq 0,300$

5.4.CALCULOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para todos los análisis estadísticos se consideró un diseño experimental completamente al azar (DCA) siendo la raza el factor experimental. La PL, PV, CC y la concentración plasmática de PAG fueron analizadas como medidas repetidas en el tiempo mediante un modelo mixto que considero la raza, los días postparto (DPP) y su interacción

como efecto fijo y la vaca anidada en la raza como efecto aleatorio utilizando PROC MIXED del paquete estadístico SAS (SAS Institute, Carey, NC, USA). Los DPP fueron considerados el factor de repetición. Para la PL se consideró una estructura de covarianza tipo AR(1). Para las demás variables se consideró una estructura de covarianza sp(spow) dado que las fechas de muestreo no tuvieron un espaciamiento uniforme en el tiempo (Littel et al., 2006). La paridad, la fecha de parto, y la fecha calendario de concepción evaluadas como covariables y se mantuvieron en el modelo siempre que $P \leq 0.05$. Las medias se separaron con LSD Fisher considerándose efecto significativo de los factores fijos en caso de $P \leq 0.05$ y tendencia con $P \leq 0.1$.

A su vez, de forma exploratoria, la concentración de PAG en función de los días de gestación (DG) fue ajustada mediante modelos polinomiales utilizando el paquete plyr del software R (R versión 3.6.3, Core Team, 2020). Para esta modelación se consideró los DG como el único regreso y los datos fueron ajustados para cada raza de forma separada. Se evaluó el ajuste a modelos polinómicos de grados creciente que fueron comparados según el criterio de Akaike (AIC, cuanto menor AIC mejor modelo), R2 y R2 ajustado.

A su vez, para poder comprender mejor la relación entre los niveles circulantes de PAG y el estatus nutricional/metabólico de los animales se estudiaron las correlaciones entre PAG y datos de balance energético, consumo estimado de energía neta y parámetros metabólicos en plasma (glucosa, NEFA, BHB, insulina, urea) (Jorge-Smeding, 2017; Jorge-Smeding et al. (2021). Dado que la concentración de PAG alcanza un plateau debido al límite superior de cuantificación del kit utilizado, se utilizaron datos hasta el día 250 postparto para evitar efectos de confusión.

A su vez, de forma complementaria a las correlaciones, la asociación entre la PAG, el balance energético y el consumo estimado de energía neta con los días postparto se estudiaron mediante regresión utilizando el paquete ggplot2 del software R (R versión 3.6.3, Core Team, 2020). Comparado con métodos más comunes como la regresión lineal, este método tiene la ventaja de poder combinar la sencillez de los mínimos cuadrados utilizados y la flexibilidad de la regresión no lineal a través del ajuste de modelos sencillos sobre subconjuntos de datos locales. El objetivo de aplicar este método era poder obtener una idea cualitativa y gráfica de las respuestas temporales de PAG, balance energético y consumo estimado de energía a lo largo de la lactancia cuando se miran las tres variables de forma superpuesta.

6. RESULTADOS

6.1. PERFILES DE CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE PAG

La concentración de PAG fue afectada por el genotipo, siendo superior ($P = 0,028$) en el genotipo N ($9,04 \pm 0,028$ ng/ml) que en el HF ($8,52 \pm 0,028$ ng/ml). Asimismo, la concentración de PAG fue afectada ($P = 0,0017$) por la interacción entre la raza por los días posparto (DPP).

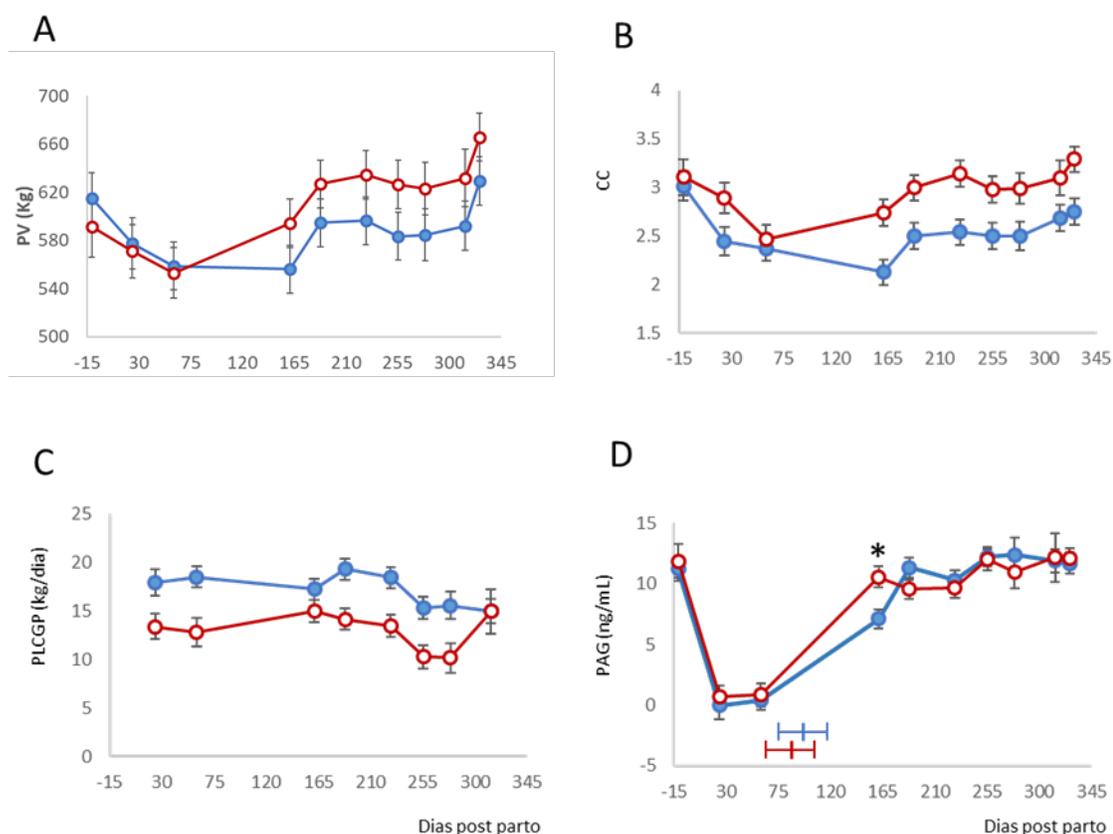
A continuación, se presenta (cuadro 2) los resultados estadísticos de ANOVA para para el peso vivo, condición corporal, producción de leche corregida por grasa y proteína (PLCGP) y proteínas asociadas a la gestación (PAG). Así mismo se presenta el perfil de concentración plasmática promedio de la hormona PAG, correspondientes al PV, CC y PLCGP para los genotipos HF y N durante el período de estudio (figura 7).

Curvas de peso vivo (PV, A), condición corporal (CC, B), producción de leche corregida por grasa y proteína (PLCGP, C) y proteínas asociadas a la gestación (PAG, D) durante el ciclo productivo de vacas Holando (HF, azul) y Normando (N, rojo). Diferencias significativas ($P < 0,05$) entre razas para una fecha dada están indicadas por *. En el panel D (PAG), la fecha de concepción (media \pm ES) de cada raza (HF, azul; N, rojo) está representada con el icono de barra y bigote.

Cuadro 2. Resultados de ANOVA para PV, CC, LCGP y PAG en vacas H y N.

	Medias			P-valor		
	HF	N	SEM	Raza	Fecha	Raza×Fecha
Peso vivo (kg)	589	616	17,2	0,27	<0,01	0,07
Condición corporal	2,54	2,97	0,098	0,01	<0,01	0,12
PLCGP (kg/día)	17,2	13	0,76	<0,01	<0,01	0,14
PAG (ng/mL)	8,52	9,04	0,028	0,03	<0,01	<0,01

Figura 7. Curvas de PV, CC, LCGP, PAG del ciclo productivo de vacas H y N.



El PV fue similar entre razas en promedio, pero tendió a estar afectado por la interacción Raza×Fecha ($P = 0,07$) dado que el PV disminuyó ($P < 0,01$) para todas las vacas durante la lactancia temprana entre los -11 y los 75 DPP, aumentando ($P < 0,01$) luego durante la lactancia media y tardía cuando las vacas N tuvieron un mayor ($P < 0,05$) PV que las vacas HF durante la lactancia tardía en primavera entre los 255 y 279 DPP (Cuadro 2, Fig. 7 A). La condición corporal fue mayor ($P = 0,01$) para las vacas N que HF en el promedio del ciclo productivo. A su vez, independiente de la raza, la CC disminuyó ($P < 0,01$) entre los -15 y los 75 DPP, observándose valores similares en los 75 y 165 DPP y aumentando ($P < 0,01$) luego a los 188 DPP para mantenerse en valores similares hasta los 279 DPP aumentando ($P < 0,01$) luego en el periodo seco a los 326 DPP (Cuadro 2, Fig. 7 B).

La PLCGP fue mayor ($P < 0,01$) en promedio para las vacas HF vs. N. Independientemente de la raza, la PLCGP se mantuvo similar entre los 24 y 161 DPP, aumentando ($P = 0,02$) luego entre los 161 y 188 DPP. Posteriormente, la PLCGP disminuyó ($P < 0,01$) hasta los 255 DPP manteniéndose en valores similares hasta el final de la lactancia (Cuadro 2, Fig. 7 C).

La concentración de PAG previo al parto (día -15) no presentó diferencias significativas entre genotipos y se situó en torno a los $11,19 \pm 0,99$ ng/ml y $11,85 \pm 1,39$ ng/ml, para HF y N, respectivamente.

A partir del parto, la concentración de PAG descendió, hasta alcanzar valores promedio en torno a cero en ambos genotipos, en los días 24 DPP (HF: $-0,04 \pm 1,14$ ng/ml; N: $0,66 \pm 0,97$ ng/ml) y 60 DPP (HF: $0,38 \pm 0,79$ ng/ml; N: $0,83 \pm 0,98$ ng/ml). Esta disminución es progresiva dado que esta hormona posee una vida media alta en la circulación materna.

A partir del día 60 DPP, la concentración de PAG experimenta un aumento, alcanzando al día 161 DPP concentraciones significativamente superiores ($P=0,0017$) a favor del genotipo N ($10,54 \pm 0,87$ ng/ml) vs. HF ($7,11 \pm 0,79$ ng/ml). Por el contrario, al día 188 DPP, la concentración de PAG fue significativamente superior ($P < 0,05$) a favor del genotipo HF ($11,31 \pm 0,79$ ng/ml) vs. N ($9,52 \pm 0,79$).

Como se observa en la gráfica, el genotipo N alcanza un pico de concentración de PAG al día 161 DPP mientras que el HF lo hace 27 días más tarde (188 DPP).

A partir del día 227 DPP y hasta el día 326 DPP la concentración de PAG se mantiene relativamente constante, no observándose diferencias significativas entre ambos genotipos de estudio.

6.2. MODELACIÓN EXPLORATORIA DE LA PAG EN FUNCIÓN DE LOS DÍAS DE GESTACIÓN

A continuación se presenta un resumen de los grados de libertad (GL), significancia global, grado de ajuste (R^2 , R^2 ajustado) y criterio de Akaike (AIC) para los modelos polinómicos (2º, 4º y 6º grado) de ajuste de la concentración plasmática de PAG en función de los días de gestación para cada raza (Holando, HF; Normando, N) (Cuadro3).

Cuadro 3. Modelos polinómicos de ajuste de la concentración plasmática de PAG en función de los DG para cada raza.

	HF					N				
	GL	P-valor	R^2	R^2 aj.	AIC	GL	P-valor	R^2	R^2 aj.	AIC
pol2	45	< 0,01	0,48	0,46	264	37	< 0,01	0,36	0,33	221
pol4	43	< 0,01	0,61	0,58	253	35	< 0,01	0,38	0,31	224
pol6	41	< 0,01	0,87	0,86	203	33	< 0,01	0,62	0,55	208

La modelación exploratoria de la dinámica de la concentración plasmática de secreción de la PAG en función de los DG para los genotipos HF y N indicó que en ambas razas el modelo con mejor ajuste (mayor R^2 y R^2 ajustado menor AIC) fue el modelo polinómico de 6º grado (Figura 8).

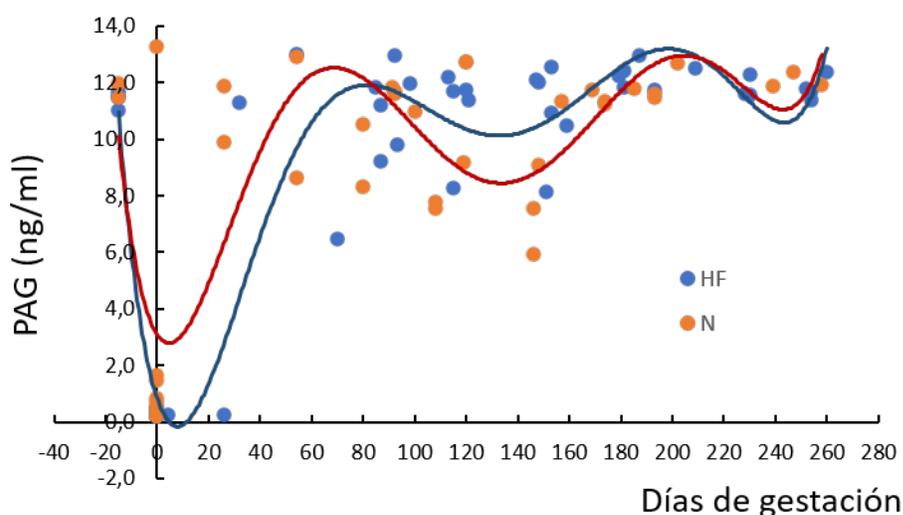


Figura 8. Curvas de modelación de la PAG en función de los DG en un ciclo biológico de vacas HF y N, en un SPBI.

La concentración plasmática de PAG para ambos genotipos se ajustó a un modelo de tipo polinomial de grado 6.

Ecuación para genotipo HF:

$$\text{PAG (ng/mL)} = 1\text{E-}11x^6 - 9\text{E-}09x^5 + 3\text{E-}06x^4 - 0,0004x^3 + 0,0209x^2 - 0,2707x + 0,8345$$

Ecuación para genotipo N:

$$\text{PAG (ng/mL)} = 1\text{E-}11x^6 - 8\text{E-}09x^5 + 2\text{E-}06x^4 - 0,0003x^3 + 0,0168x^2 - 0,1357x + 3,0847$$

Este modelo representa las variaciones de la concentración de PAG en función de los días de gestación (DG), observándose una caída de los niveles de dicha hormona desde el parto, para luego aumentar en el momento de la concepción. En este momento la curva que representa a las vacas N se encuentra por encima de aquella de las vacas HF. Seguidamente, se revierte este patrón a favor de las vacas HF, observándose un movimiento "ondular" descendente entre los días 100 y 200 DG (gestación media), para ambos genotipos, lo que coincide con la primavera, momento en el cual la oferta de forraje aumentó y se restableció el balance energético de los animales. Posteriormente, la

concentración de PAG aumenta y se mantiene en valores en torno a los observados en el parto.

6.3. CORRELACIONES ENTRE LA PAG Y CARACTERÍSTICAS DE LA PRODUCCIÓN LECHERA PARA LOS GENOTIPOS HF Y N EN UN SPBI

En el siguiente cuadro (Cuadro 4) se presentan los coeficientes de correlación de Pearson (r) entre la PAG y un grupo de características de la producción lechera, para los genotipos de estudio, en un SPBI. Se observa que la PAG presenta una correlación significativa, alta y positiva con los DPP y DG lo cual está en concordancia con el aumento de las concentraciones de PAG observadas a medida que avanza la gestación (figura 7 D). En el mismo sentido, se observa una correlación alta y positiva con el PU asociado al aumento del útero grávido.

Cuadro 4. Correlaciones entre la (PAG) y características de la producción lechera para los genotipos lecheros HF y N en un SPBI.

Características	Proteína asociada a la gestación (PAG)		
	Correlación (r)	P -valor	Sig.
<i>Período</i>			
Días posparto (DPP)	0,84	3,11E-15	***
Días de gestación (DG)	0,77	9,24416099E-12	***
<i>Características del animal</i>			
Peso Vivo (PV)	0,18	0,19974	<i>n.s</i>
Peso del útero (PU)	0,57	6,23540121E-06	***
Condición corporal (CC)	0,11	0,40535	<i>n.s</i>
<i>Balance energético</i>			
Balance energético (BE)	0,51	0,00019	***
<i>Metabolitos sanguíneos</i>			
Glucosa	0,41	0,00216	**
NEFA	-0,67	4,04E-07	***
Urea	0,24	0,08652	<i>n.s</i>

Sig.: nivel de significancia estadística; *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$; *n.s*: no significativo

La PAG no presentó asociación con variables como el PV y la CC, situándose en valores no significativos de correlación de 0,18 y 0,11, respectivamente. En cuanto a la asociación entre la PAG y el BE, se observó una correlación significativa, alta y positiva correspondiente a $r=0,51$.

La correlación de la PAG con metabolitos sanguíneos como la glucosa fue de 0,41 y significativa ($P=0,00216$). No se observó correlación de la PAG con la urea, sin embargo, la PAG presentó una correlación alta y negativa ($r=-0,67$), altamente significativa (P - valor, $4,04E-07$) con los NEFA.

En el siguiente cuadro (cuadro 5) retoma las correlaciones entre la PAG, la producción de lechera y la composición de la leche para ambos genotipos de estudio.

Cuadro 5. Correlaciones entre la PAG, características la producción y composición de leche para HF y N en un SPBI.

Características	Proteína asociada a la gestación (PAG)		
	Correlación (r)	P-valor	Sig.
<i>Producción</i>			
Producción de leche	-0,02	0,87223	<i>n.s</i>
<i>Composición de la leche</i>			
% Proteína	-0,28	0,04142	**
% Grasa	0,25	0,06611	<i>t</i>
% Lactosa	-0,38	0,00447	**

Sig.: nivel de significancia estadística; *: $P<0,05$; **: $P<0,01$; ***: $P<0,001$; *n.s*: no significativo

No se observó asociación entre la PAG y la producción de leche, ni tampoco con el % de proteína y % de grasa de la leche. No obstante, el % de lactosa presentó una correlación media-alta, negativa ($r=-0,38$) y significativa ($P=0,00447$) con la PAG (Cuadro 5).

Las correlaciones más significativas entre la PAG y metabolitos, así como con los sólidos de la leche, se presentan en la figura 9.

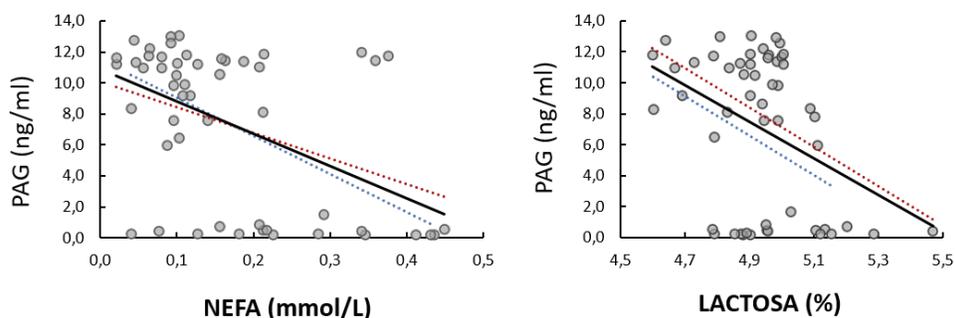
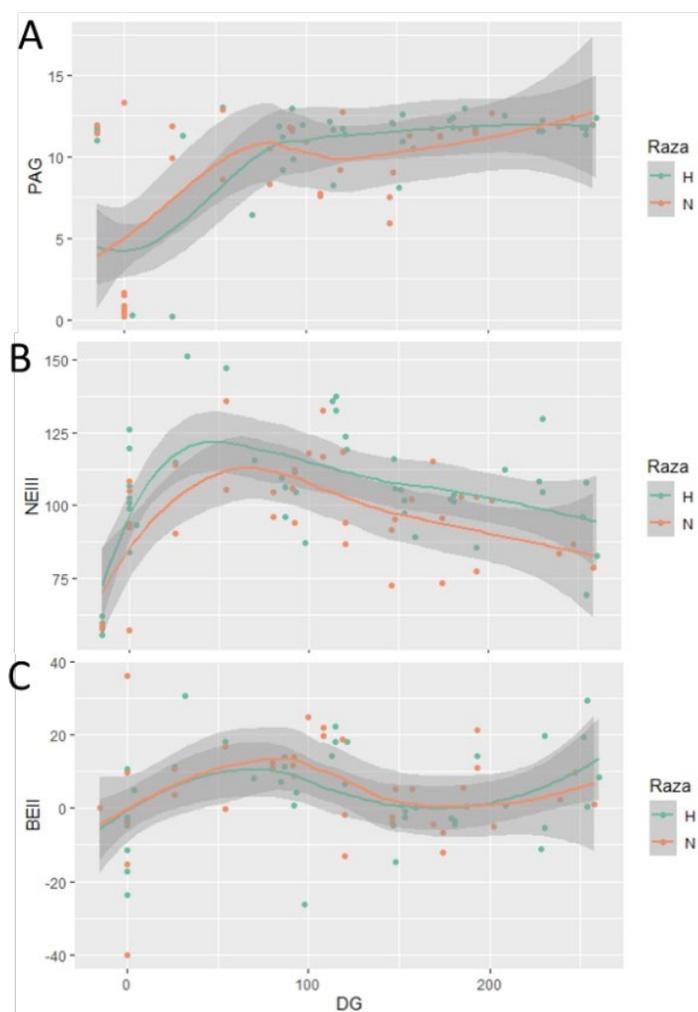


Figura 9. Correlación entre la PAG y NEFA (A) y PAG y % de Lactosa (B) para los genotipos HF y N, en un SPBI.

La línea entera (—) corresponde a la correlación tomando en cuenta ambos genotipos, línea punteada roja (---) corresponde al genotipo N, línea punteada azul (---) corresponde al genotipo HF.

Nótese la relación inversa entre las concentraciones de PAG y NEFA, donde a mayor concentración plasmática de NEFA se observa una menor concentración plasmática de PAG. En el rango de concentraciones de NEFA de 0,1 a 0,2 mmol/L, el genotipo N presenta menor concentración de PAG. Por el contrario, a partir de 0,2 mmol/L, el genotipo HF ve más afectada la secreción de la hormona PAG.

En lo que respecta al % de lactosa, como se mencionó anteriormente, la correlación es negativa y en la gráfica se puede observar que la línea que representa al genotipo N se mantiene por encima de la línea media en todo el rango de concentraciones de lactosa.



En gris se indica el intervalo de confianza de cada curva de regresión.

Figura 10. Gráficos de regresión local de la concentración plasmática de PAG (A), CEN (B) y BE (C) según la raza, entre los -15 y 288 DG.

En términos cualitativos, las curvas de regresión local indican que la PAG tuvo un perfil caracterizado por un aumento durante la primera etapa de gestación manteniéndose luego en niveles similares hasta el final de esta (Fig. 10 A). Mientras tanto, el balance energético se caracterizó por aumentar entre los -15 y 100 DG partiendo de valores negativos, luego describió una disminución y posterior recuperación hacia el final de la gestación (Fig. 10 B). Según la curva de regresión local, el consumo estimado de energía neta presentó un aumento entre los -15 y 60 DG, para luego disminuir paulatinamente y de forma constante hasta el final de la gestación (Fig. 10 C).

7. DISCUSIÓN

La PAG es secretada precozmente por las células binucleadas del trofoectodermo, para luego pasar a la circulación periférica materna durante toda la gestación, pudiéndose cuantificar en el plasma sanguíneo mediante métodos inmunológicos (RIA, ELISA). Desde su puesta en evidencia en la década de los años 80 (Butler et al., 1982) los esfuerzos en la investigación se han concentrado en el uso de la PAG como herramienta de diagnóstico precoz de gestación. En este sentido, mediante la cuantificación de PAG en sangre es posible diagnosticar gestaciones a partir de los 28 días post concepción. Por otra parte, la PAG también es interesante desde el punto de vista del seguimiento de la gestación ya que aporta información sobre la viabilidad del proceso y evidencia pérdidas embrionarias tardías y fetales (Zoli et al., 1991, Sousa et al., 2003). Sin bien en la actualidad se cuenta con evidencia científica que indica que la PAG es una señal endócrina que forma parte de un complejo sistema de comunicación entre el compartimento materno y fetal, continúan sin ser esclarecidos sus roles biológicos. En especial su vinculación con el balance energético de los animales en los sistemas de producción lechera, su asociación con el ambiente nutricional y el estrés calórico y los mecanismos metabólicos a través de los cuales estos factores afectan la viabilidad de la placenta y el crecimiento intrauterino.

La mayoría de los trabajos publicados se centran en los perfiles de PAG en sistemas estabulados donde las estrategias de alimentación están diseñadas para cubrir los requerimientos nutricionales de genotipos de alto mérito genético (Mialon et al., 1993, Shahin et al., 2014) y muy pocos trabajos se han desarrollado en condiciones extensivas con base pastoril (Mercadante et al., 2016, Santos et al., 2018). En el presente trabajo, se cuantifico la concentración plasmática de PAG durante todo un ciclo productivo de vacas lecheras multíparas de dos razas contrastantes: por un lado, animales con una alta especialización para la producción de leche (HF) y por el otro, animales doble propósito (N), en un sistema pastoril de baja dependencia de insumos externos con un uso de concentrados por lactancia en torno a los 700 kg MS/VO.

La cuantificación de la PAG se llevó a cabo utilizando un kit comercial ELISA cualitativo orientado al diagnóstico de preñez, sin embargo, al igual que en nuestro estudio, trabajos recientes han utilizado este mismo kit para realizar estudios de la dinámica de secreción de la PAG (Ricci et al., 2015, Perry et al., 2021).

En general, el patrón de secreción de la PAG del presente trabajo se corresponde con los reportados por otros autores para bovinos tanto de carne como de leche (Sasser et al., 1986, Mialon et al., 1993, Patel et al., 1997, Green et al., 2005, Shahin et al., 2014). En tal sentido, en nuestro trabajo se observó que todas las vacas, independientemente de

la raza, presentaron un máximo en las concentraciones de PAG durante el parto (-11 DPP). Este primer resultado concuerda con los reportados por Mialon et al. (1993) quienes también reportan un pico de concentración de PAG (PSPB60) previo al parto, sin diferencias significativas entre genotipos lecheros HF y doble propósito, N.

Puesto que la PAG posee una larga vida media en torno a 7-8,8 días en promedio para las razas taurinas (Kiracofe et al., 1993), luego del parto se observó un descenso de la concentración de PAG, remanente de la gestación anterior, alcanzando valores cercanos a cero recién al día 60 DPP lo cual está en concordancia con las indicaciones del kit IDEXX. No obstante, difiere de trabajos en los que se estudió la vida media de la hormona posparto mediante cuantificación de la PAG por RIA, donde se reporta que para alcanzar una concentración residual $< 0,02$ ng/ml se requiere en promedio de 85 días para el genotipo N y 87 días para el H (Mialon et al., 1993).

Posteriormente, la concentración de PAG a los 165 DPP fue mayor que a los 60 DPP en ambas razas, lo que es concordante con el hecho de que las vacas del presente trabajo quedaron preñadas hacia el final de la lactancia temprana a los 88 (± 15 DPP) y 104 (± 14 DPP) en promedio para las razas N y HF, respectivamente. A medida que la PAG es secretada por el trofoblasto, avanza el desarrollo embrionario y fetal estos determinan el crecimiento de la placenta y, en consecuencia, existe un aumento en secreción de PAG. En este sentido es de destacar que en nuestro trabajo las concentraciones plasmáticas de PAG estuvieron asociadas positivamente con el peso del útero, poniendo de manifiesto esta asociación entre secreción placentaria y desarrollo embrionario-fetal. Patel et al. (1997) reportaron que la edad del embrión fue positivamente asociada con los niveles de PAG. A su vez, Barbato et al. (2017) observaron un incremento en la expresión de PAG hasta el día 105 post IA, correspondiente al mayor crecimiento placentario en el búfalo de agua.

Si bien en términos promedio la concentración de PAG fue significativamente mayor para las vacas N vs. HF, los perfiles de PAG plasmática se revelaron muy similares entre ambas razas a lo largo de todo el ciclo productivo. Contrariamente, Ackermann et al. (2021) en su trabajo de tesis, trabajando en vacas HF y N multíparas del mismo rodeo experimental, pero en otro año, reportan no haber encontrado diferencias significativas entre razas durante el primer tercio de gestación. No obstante, en las semanas 2 a 6 de gestación reportan un efecto significativo de la interacción raza \times semana de gestación, observando una mayor concentración de PAG a favor de la raza N (Ackermann et al., 2021). Por su parte, Shahin et al. (2014) reportaron una menor concentración de la PAG al inicio de la gestación, en las vacas lecheras Holstein en comparación con las doble propósito, Simmental. Mialon et al. (1993) comparando perfiles de PAG de vacas HF, N y Charolais, proponen que la menor concentración de PAG presente en las razas lecheras podría estar asociada a una mayor tasa metabólica presente en las razas de alto mérito genético para producción de leche. En este sentido, debe notarse que en nuestro trabajo la PLCGP fue mayor para las vacas HF vs. N mientras que el PV fue similar en promedio lo

que indica una mayor actividad metabólica por unidad de peso vivo en términos de síntesis de leche. En el mismo sentido, en base a un mayor número de vacas (14 HF, 13 N) que incluían las 12 vacas seleccionadas en la presente tesis, Jorge-Smeding et al. (2021) reportaron no solo una mayor PLCGP para las vacas HF sino, también, un mayor consumo estimado de energía neta lo que naturalmente debería conducir a un metabolismo más acelerado en las vacas HF vs. N.

Por otra parte, es interesante notar que en concordancia con lo reportado previamente por Jorge-Smeding et al. (2021), las CC fue menor en promedio para las vacas HF vs. N. En este sentido, una menor CC asociada a movilizaciones de reservas corporales más intensas están, en general, asociados a una menor eficiencia reproductiva. Así, Berry et al. (2007) en su revisión de la literatura mencionan que las mayores pérdidas de CC se asocian a altos rendimientos de producción de leche presentes en vacas de mayor mérito genético. Asimismo, Roche et al. (2007) señalan una relación desfavorable entre el máximo de pérdida de CC (nadir) y el comportamiento reproductivo, tales como la tasa de preñez a la primera inseminación o incluso el intervalo parto-concepción.

En relación a la comparación entre las razas HF y N, Delaby et al. (2009) reportaron que en un experimento realizado con dos planos nutricionales (alto y bajo), las vacas HF tuvieron una mayor producción de leche que estuvo asociado a una mayor movilización de reservas corporales y peor comportamiento reproductivo, en particular, a la primera I.A. A su vez, Balberini et al. (2012) reportan que en un sistema lechero con bajo aporte nutricional, similar al del presente trabajo, las vacas de raza H tardaron más tiempo en retornar la ciclicidad posparto y tuvieron mayores dificultades para volver a preñarse en comparación con vacas N. Finalmente, agregan que las vacas H que recibieron un mayor aporte nutricional, presentaron mayores pérdidas embrionarias tardías (27%; $P=0,01$) a causa de la fuerte competencia entre los nutrientes destinados a la producción de leche y a la reproducción.

Utilizando datos históricos del mismo rodeo experimental del presente trabajo, André (2020), sobre un total de 587 lactancias pertenecientes a 233 vacas lecheras en producción, reportó que las vacas N presentaron un menor intervalo parto concepción, menor intervalo inter parto y mayor proporción de vacas con dos partos en años consecutivos que las vacas Holando.

Otro elemento a considerar, es el desfasaje observado en el presente trabajo entre la concentración de PAG de las vacas N vs. las HF. Al día 160 DPP, las vacas N alcanzaron una concentración significativamente mayor (+32%) que las vacas HF, tardando estas últimas, 27 días más en llegar a un valor similar de concentración. Como es sabido, cambios en la concentración plasmática de NEFA conjuntamente con cambios en la CC, reflejan la dinámica de movilización de las reservas corporales, siendo mayor en la lactancia temprana a consecuencia de la movilización de tejido adiposo para cubrir la demanda energética requerida para la producción de leche. Jorge-Smeding et al. (2021)

sobre la base de datos metabólicos que incluían a las vacas del presente estudio observaron que el nadir de CC para las vacas N se situó en torno a la semana 6 posparto mientras que en el genotipo HF ocurrió posteriormente, en torno a la semana 18. En este sentido, resulta interesante notar que las concentraciones plasmáticas de PAG y NEFA se correlacionan negativamente, de manera que las mayores concentraciones de PAG y menores de NEFA observado para las vacas N podrían estar de alguna manera vinculadas. En línea con lo reportado por Delaby et al. (2009), es posible que este mayor tiempo de movilización de reservas en el ganado HF pueda repercutir en el reinicio de la actividad ovárica posparto de cada uno de los genotipos de estudio, pudiendo al menos parcialmente, relacionarse con el desfasaje observado entre la concentración de PAG de ambos genotipos al día 160 DPP. Es importante mencionar, por tanto, que estas mayores concentraciones de PAG a los 160 DPP observado para las vacas N en parte podría deberse a que la concepción en estas vacas ocurrió 20 días antes (88 vs. 104 DPP) que en las vacas HF, de manera que a los 160 DPP la gestación estaba algo más avanzada en las vacas N.

Asimismo, se ha observado que la severidad del BEN influye en la concentración de metabolitos sanguíneos, incluyendo NEFA (Ospina et al., 2013). En tal sentido, una elevada concentración de los NEFA se ha utilizado previamente como un indicador de BEN en vacas lecheras Garverick et al. (2013). Jorge-Smeding et al. (2021) reportaron que la concentración plasmática de NEFA aumentó por un corto período de tiempo en las vacas N en comparación con las HF, lo cual se tradujo en una mayor pérdida de CC en las vacas HF que en las N como fuera explicado anteriormente. Rojas-Canadas et al. (2020) reportaron en un estudio transversal de carácter observacional y prospectivo, realizado sobre un total de 2700 vacas lecheras en sistemas pastoriles en Irlanda, que las vacas con una baja CC tanto en la semana 3 como en la semana 7 posparto presentaron un peor desempeño reproductivo en comparación con vacas con óptima CC. En lo que respecta a la PAG, Mercadante et al. (2016) reportan no haber obtenido ninguna asociación de esta hormona con la CC.

La concentración de los metabolitos sanguíneos ha sido propuesta en previos estudios como una herramienta para predecir el balance energético (BE) de un rodeo y el comportamiento reproductivo asociado (Ospina et al., 2010, Garverick et al., 2013). A su vez, situaciones de BEN muy profundo ha sido asociadas con una gran incidencia de ciclos estrales irregulares, lo cual trae aparejado un aumento en el intervalo parto-primer servicio, asociado a efectos deletreos sobre el desarrollo folicular y sus ovocitos (Wathes et al., 2007c). Jorge-Smeding et al. (2021) reportaron que las vacas N presentaron un BE positivo a las 10 semanas posparto mientras que las vacas HF se encontraban aún en BEN a la semana 20 posparto, en un SPBI E. Este hecho, marca claramente que ambas razas cuentan con diferente dinámica de partición de la energía lo cual podría tener repercusiones sobre el comportamiento reproductivo, hecho que podría estar vinculado al desfasaje de las concentraciones de PAG al día 160 DPP, entre los genotipos N y HF, en el presente trabajo. Por su parte, Garverick et al. (2013) reportaron que las vacas que concibieron en la primera inseminación presentaron menor concentración de NEFA

circulante, en comparación con las vacas que no concibieron. Estos mismos autores, indicaron que el BEN estimado a través de la concentración posparto de los NEFA, tuvo un efecto sobre la tasa de preñez a la primer IA, la cual tuvo lugar aproximadamente 70 días posparto.

Asimismo, existen otros factores que podrían afectar la secreción de PAG de forma indirecta, mediante un aumento de los días abiertos. En tal sentido, Garverick et al. (2013) reportan que el efecto del BEN parecería tener mayor impacto una vez que los folículos comenzaron la fase de crecimiento, por lo que la ventana crítica de exposición de los folículos al BEN podría situarse entre la semana 6 y 12 previo a de la ovulación. Lussier et al. (1987) reporta que alcanzar el tamaño ovulatorio, tomaría alrededor de 2 ciclos estrales (42 d). Asimismo, Britt (1994) citado por Garverick et al. (2013) sugirió que los eventos que ocurren durante el crecimiento folicular temprano pueden afectar la fertilidad posterior y, por lo tanto, estar asociada con baja fertilidad cuando las vacas son inseminadas a los 70 a 100 d posparto. Por su parte, Jorritsma et al. (2004) reportaron que la fecundación, escisión y desarrollo embrionario después de la maduración *in vitro* se redujeron en presencia de los NEFA. En tal sentido, se ha reportado que una alta concentración de NEFA podría tener efectos sobre los oviductos y útero. Por su parte, Wathes et al. (2011) han observado que las vacas que se encuentran en BEN severo experimentan cambios en IGF e Insulina, los cuales podrían afectar al útero, el cual se encuentra en el proceso de involución uterina. Asimismo, cambios en las vías de señalización de estos factores también podrían limitar la interacción feto-uterina, necesaria para el óptimo desarrollo de la placenta y el crecimiento fetal.

En el presente estudio se determinaron las correlaciones entre la concentración de PAG y algunas de las características relevantes de importancia económica en la producción lechera. La PAG presentó una correlación significativa, alta y negativa con la concentración de NEFA, lo cual concuerda con los fundamentos anteriormente desarrollados.

Respecto a la correlación entre la PAG y la concentración de glucosa, esta presentó una correlación significativa, media y positiva con la concentración de PAG. En la actualidad, no se reportan datos en la literatura científica respecto a esta correlación. Sin embargo, dado que la glucosa es la principal fuente de energía para el crecimiento y desarrollo del conceptous, es posible postular que esta correlación sea directamente proporcional entre ambas variables. Por su parte, Green et al. (2012) reporta que una adecuada concentración de glucosa es necesaria para el correcto funcionamiento y la preparación del ovario, oviductos y útero para la gestación subsecuente. Garverick et al. (2013) reportaron que la concentración de glucosa y de NEFA en sangre fueron mayores durante las primeras 3 semanas posparto en las vacas que quedaron preñadas a la primera inseminación/servicio. La mayor concentración de glucosa en la sangre puede de alguna manera facilitar la involución uterina y preparar el útero para el establecimiento y mantenimiento de la gestación (Wathes et al., 2011). También es posible que la glucosa

posparto temprana imprima las células del útero y el ovario para que funcionen de manera diferente durante el período de reproducción. La naturaleza específica de esta impronta metabólica del útero y el ovario se desconoce en este momento, pero se ha demostrado el potencial de la nutrición para imprimir la capacidad funcional a largo plazo de los tejidos en el bovino (Funston et al., 2010). Una reducida concentración de glucosa en vacas lactantes en el posparto temprano podría asociarse a la disminución de la fertilidad y al aumento de los días abiertos.

En relación a la concentración de urea y su correlación con la PAG, no se observó correlación significativa. Una alta o baja concentración de urea en sangre ha sido asociada con una reducción en la fertilidad de las vacas lecheras, en particular asociada a un incremento en el intervalo parto-concepción (Cheng et al., 2015). Wathes et al. (2007b) establecieron múltiples correlaciones entre la fertilidad y los perfiles metabólicos y endócrinos, reportando que las vacas que tuvieron mayor intervalo parto-concepción, fueron aquellas que presentaron elevadas concentraciones de urea a la semana 7 postparto y un mayor rendimiento de producción lechera asociada al pico de producción de leche.

En cuanto a las correlaciones de la PAG con las características de importancia económica para la producción lechera, en el presente trabajo se observó que la concentración de PAG no se correlacionó con la producción de leche ($r=-0,02$) durante el ciclo biológico de estudio. Lopez-Gatius et al. (2007) estudiando los factores que afectan la concentración de PAG en la gestación temprana en vacas de alta producción lechera (41 Kg), reportaron que la concentración de PAG presentó una correlación alta-negativa y significativa, entre la producción de leche y la PAG al día 63 de gestación. En el mismo sentido, Ricci et al. (2015) reportaron que tanto la concentración plasmática de PAG en leche como en plasma, presentaron una correlación negativa con la PAG en vacas primíparas y multíparas en la gestación temprana (25 y 35 días post IA). En contraposición, Mercadante et al. (2016) reportan que las vacas con mayores rendimientos de producción de leche incrementaron la concentración plasmática de PAG. Mientras que el trabajo de Serrano et al. (2009), estudiando los posibles factores que afectan la concentración plasmática de PAG durante toda la gestación, en vacas lecheras de alto mérito genético, no encontraron efecto significativo de dicha hormona sobre la producción de leche. Sin embargo, en concordancia con nuestro resultado, Santos et al. (2018) reportan que no encontraron correlación entre la PAG medida en leche y la producción de leche ($r=0,07$), estudiando los factores genéticos y no genéticos asociados a los perfiles de PAG en vacas Holstein. Si bien la literatura es escasa y la mayor parte de los trabajos reportados se han realizado en condiciones de estabulación en vacas lecheras de muy alto mérito genético, los resultados son inconsistentes, por lo que se requieren de mayores ensayos experimentales para su esclarecimiento.

Con el fin de evitar las prácticas invasivas como el sangrado de los animales, recientemente se han propuesto varios trabajos científicos que correlacionan el estatus energético de las vacas, con el comportamiento reproductivo y con la producción lechera

y la composición de sólidos de la leche (Tiplady et al., 2022). En nuestro trabajo, la concentración de PAG presentó una correlación baja con el porcentaje de grasa y una baja y negativa con el % de proteína. Santos et al. (2018) describen que obtuvieron correlaciones positivas de la PAG con el % de grasa y proteína. Respecto al % de lactosa, este presentó una correlación moderada a alta y negativa. No se reportan en la literatura antecedentes que asocien a la concentración de PAG y el % de lactosa. Sin embargo, Rodríguez-Cutzal et al. (2021) recientemente publicaron un estudio con vacas lecheras HF, Jersey y cruza de alta producción en sistemas pastoriles de Nueva Zelanda, en el cual reportaron que el porcentaje de lactosa en la leche fue asociado negativamente ($P < 0.05$) con las tasas de preñez al día 21 y al día 42 post IA.

Durante la gestación, la secreción de PAG es codificada y regulada por el genoma del embrión, pero su concentración también puede ser afectada por factores inherentes a la madre como el balance energético y el ambiente, como la nutrición (Zoli et al., 1992). Respecto al modelo polinomial al cual se ajustó la dinámica de secreción de la PAG del presente trabajo, es interesante notar que en torno a la gestación media (días 80 a 180 en promedio), tanto la curva para el genotipo N como para el HF descienden. Este hecho podría relacionarse al restablecimiento del BEN, asociado a un efecto ambiental vinculado con el aumento de la oferta de forraje que ocurre en la primavera. Wallace et al. (1997) reportan que los perfiles de concentración de PAG fueron influenciados por el plano nutricional que recibieron los animales durante la gestación. Dichos autores observaron que la concentración de PAG fue menor en ovejas primíparas sometidas a un mayor plano nutricional durante la gestación que aquellas que recibieron un menor aporte energético. Alvarez-Oxiley et al. (2021) reportan que la concentración de PAG fue mayor al día 30 post IA, en vacas de cría alimentadas con bajo un plano nutricional (4 Kg MS/Kg PV) vs vacas alimentadas con un alto plano (8 Kg MS/Kg PV) nutricional. Asimismo, Sousa et al. (2003) reportan que la concentración de PAG se vio aumentada en vacas con una muy baja CC. Dichos autores proponen que la señal endocrina de la PAG se amplificaría en los casos que no se cuente con suficientes reservas corporales para asegurar el crecimiento fetal. En el presente estudio, ambos genotipos descienden sus concentraciones de PAG durante la primavera, sin embargo, el genotipo N es quien llega a valores más bajos de PAG. Posiblemente esto pueda deberse a que en la gestación media, la producción de leche ya no compite con el crecimiento fetal en el genotipo N. Sin embargo, en el genotipo HF los niveles de producción son mayores que en el genotipo N, solapándose con los requerimientos de crecimiento fetal que en la gestación media comienzan a incrementarse.

8. CONCLUSIONES

Las vacas doble propósito tienen un menor rendimiento de producción lechera, lo cual se traduce en una menor movilización de sus reservas corporales (NEFA y CC), por lo tanto estos animales reinician su ciclicidad posparto antes que aquellos animales que fueron seleccionados genéticamente para producción de leche, como la raza Holando.

Se encontraron diferencias raciales significativas en la concentración de PAG dejando en manifiesto el mejor equilibrio en cuanto producción y reproducción que tiene la vaca Normando en SPBI.

Dado que la PAG es considerada una señal endocrina que comunica el compartimento materno con el fetal, la concentración de PAG puede ser un buen indicador del estatus nutricional de la madre, el cual está vinculado directamente a cubrir los requerimientos energéticos para el crecimiento y desarrollo fetal. El seguimiento de la PAG durante la gestación toma relevancia en sistemas pastoriles de baja dependencia de insumos externos, donde la producción está sujeta a las variaciones estacionales de la disponibilidad de pasturas.

Así mismo la dinámica de secreción de la PAG a lo largo de la gestación permitiría identificar periodos de vulnerabilidad energética donde es posible que las vacas sean más propensas a presentar pérdidas reproductivas.

9. RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar la dinámica de secreción de la proteína asociada a la gestación (PAG) durante un ciclo biológico en bovinos lecheros Holstein Friesian (HF) y doble propósito, Normando (N), en un sistema de producción lechera de base pastoril con poca incidencia de suplementos externos (SPBI). Con el fin de esclarecer la relación entre los niveles de PAG circulante y el estado nutricional/metabólico de los animales, se determinaron las correlaciones entre PAG y el balance energético (BE), el consumo estimado de energía neta (CEN), el peso vivo (PV), el peso del útero (PU), condición corporal (CC), parámetros metabólicos (urea, glucosa, NEFA), producción de leche (PL), producción de leche corregida por grasa y proteína (PLCGP) y composición de sólidos de la leche (% proteína, % grasa, % de lactosa). Además, se estableció un modelo matemático exploratorio para explicar la dinámica de secreción de PAG a lo largo del ciclo biológico. El experimento se realizó en la Estación Experimental Bernardo Rossengurtt de la Facultad de Agronomía, Udelar. Se seleccionaron 12 vacas lecheras multíparas, de las razas N (n = 6) y HF (n = 6) según su fecha de concepción (15/07/2016 ± 13 días). La producción de leche (PL) se midió cada dos semanas y una vez al mes, la composición de la leche. La concentración de PAG en plasma se midió preparto (día -11) y posparto los días 24, 60, 161, 187, 227, 255, 279, 313 y 326, a lo largo del ciclo biológico. La concentración media de PAG considerando todo el período de estudio se vio significativamente afectada por el genotipo, siendo mayor (P = 0,03) en el genotipo N (9,04 ± 0,028 ng/ml) que en el HF (8,52 ± 0,028 ng/ml). La concentración plasmática de PAG para ambos genotipos se ajustó a un modelo polinomial de grado 6. Así mismo, PAG presentó una correlación alta y negativa (r=-0.67), altamente significativa (P-valor, 4.04E-07) con los NEFAs. El % de lactosa presentó una correlación media-alta, negativa (r=-0,38) y significativa (P=0,00447) con la PAG. Los perfiles de PAG del presente trabajo pusieron en evidencia que la raza Normando la cual moviliza reservas corporales en un período breve en comparación a las vacas de la raza HF, presentan un mejor comportamiento reproductivo. Además, en los sistemas pastoriles con fluctuaciones estacionales en la oferta de forraje, la concentración de PAG a lo largo de la gestación podría ser un buen indicador del estado nutricional de la madre, lo cual está directamente relacionado con la demanda energética para el crecimiento y desarrollo fetal.

Palabras clave: razas lecheras, Holstein Friesian, Normando, proteína asociada a la gestación, parámetros metabólicos, composición de leche.

10. SUMMARY

The aim of this study was to determine the secretion dynamics of the pregnancy-associated protein (PAG) during a biological cycle in dairy cattle Holstein Friesian (HF) and dual purpose Normande (N), in a pastoral-based dairy production system with little incidence of external supplements (SPBI). In order to better understand the relationship between circulating PAG levels and the nutritional/metabolic status of the animals, correlations were determined between PAG and energy balance data (EB), estimated net energy consumption (EC), live weight (LW), uterus weight (UW), body condition score (BCS), plasma metabolic parameters (urea, glucose, NEFA), milk yield (MY), Fat-and protein-corrected milk yield (FPCM) and milk solids composition (% protein, % fat, % lactose). Moreover, an exploratory mathematical model was established to explain the dynamics of PAG secretion throughout the biological cycle. The experiment was carried out at the Bernardo Rossengurt Experimental Station of the Agronomy Faculty, UdelaR. Twelve multiparous dairy cows, N (n = 6) and HF (n = 6) breeds were selected according to their conception date (07/15/2016 \pm 13 days). Milk Yield (MY) was measured every two weeks, and once a month milk composition. Plasma PAG concentration was measured prepartum (day -11) and postpartum on days 24, 60, 161, 187, 227, 255, 279, 313 and 326, through the biological cycle.

The mean PAG concentration considering the entire study period was significantly affected by the genotype, being higher ($P = 0.03$) in the N genotype (9.04 ± 0.028 ng/ml) than HF (8.52 ± 0.028 ng/ml). The plasma concentration of PAG for both genotypes was adjusted to a polynomial model of degree 6. PAG presented a high and negative correlation ($r=-0.67$), highly significant (P - value, $4.04E-07$) with the NEFAs. The % of lactose presented a medium-high, negative ($r=-0.38$) and significant ($P=0.0044$) correlation with the PAG. The PAG profiles of the present study showed that the Normando breed, which mobilizes body reserves in a short period compared to HF breed, have a better reproductive performance. In addition, in pastoral systems with seasonal fluctuations in forage supply, the concentration of PAG throughout gestation could be a good indicator of the nutritional status of the mother, which is directly related to the energy demand for growth and fetal development.

Keywords: dairy breeds, Holstein Friesian, Normande, pregnancy associated glycoprotein, metabolic parameters, milk composition.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Ackermann, E.; Casaretto, I.; Silva-Bentancour, E. 2021. Utilización de la proteína asociada a la gestación (PAG) como herramienta de diagnóstico y seguimiento de preñez en vacas lecheras Holando y Normando en condiciones de pastoreo. Tesis Dr. en Ciencias Veterinarias. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Veterinaria. 48 p.
2. Alvarez-Oxiley, A.; Orcasberro, M. S.; Zabala, R.; Machado, G.; Do Carmo, M.; Jorge-Smeding, E. 2021. Pregnancy Associated Glycoproteins (PAG) concentrations at early gestation in beef cows grazing two native pasture allowance. In: International Congress on Farm Animal Endocrinology (2021, Isle of Palms, South Carolina). Proceedings. s.n.t. 1 p.
3. André, M. 2020. Holando y Normando: desempeño en un sistema de producción de leche limitando uso de suplementos en el noreste del Uruguay. Tesis Mag. en Ciencias Agrarias. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 78 p.
4. Armstrong, D. G.; Baxter, G.; Hogg, C. O.; Woad, K. J. 2002. Insulin-like growth factor (IGF) system in the oocyte and somatic cells of bovine preantral follicles. *Reproduction*. 123(6): 789 - 797.
5. Astessiano, A. L.; Chilibroste, P.; Fajardo, M.; Laporta, J.; Gil, J.; Mattiauda, D.; Meikle, A.; Carriquiry, M. 2012. Hepatic expression of GH-IGF axis genes in Holstein cows with different nutritional managements during early lactation. *Journal of Dairy Science*. 95(Suppl. 2): 348.

6. Astigarraga, L.; Álvarez, J.; De Hegédus, P.; Armand Ugon, H.; Grau, M.; Vieira, X.; Lavecchia, E.; Lucas, J.; Mello, J. L.; Porcile, V.; Sommer, P. 2019. Sistemas de producción de leche para el noreste del país. Montevideo, INIA. 91 p. (Serie FPTA no. 76).
7. Auad, J.; Cerutti, J.; Cooper, L.; Lozano, N. A. 2019. Estructura de la placenta y su impacto en la transferencia de la inmunidad materno-fetal: revisión en mamíferos domésticos. *Método*. 4(2): 52 - 62.
8. Bagnato, A.; Oltenacu, P. A. 1994. Phenotypic evaluation of fertility traits and their association with milk production of Italian Friesian cattle. *Journal of Dairy Science*. 77: 874 - 882.
9. Baker, L. D.; Ferguson, J. D.; Chalupa, W. 1995. Responses in urea and true protein of milk to different protein feeding schemes for dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 78: 2424 - 2434.
10. Balberini, L.; Cutullic, E.; Delaby, L. 2012. Les performances de reproduction des vaches laitières Holstein et Normande face à deux stratégies d'alimentation différent selon les étapes du cycle de reproduction. Lyon, ISARA. 9 p.
11. Barbato, O.; Menchetti, L.; Sousa, N. M.; Malfatti, A.; Brecchia, G.; Canali, C.; Beckers, J. F.; Barile, V. L. 2017. Pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) concentrations in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) during gestation and the postpartum period. (en línea). *Theriogenology*. 97: 73 - 77. Consultado 21 abr. 2022. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.04.021>.
12. Bauman, D. E.; Currie, W. B. 1980. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *Journal of Dairy Science*. 63: 1514 - 1529.

13. Beam, S. W.; Butler, W. R. 1999. Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. *Journal of Reproduction and Fertility*. 54: 411 - 424.
14. Bedere, N.; Delaby, L.; Ducrocq, V.; Leurent-Colette, S.; Disenhaus, C. 2016. Toward improved postpartum cyclicity of primiparous dairy cows: effects of genetic merit for production traits under contrasting feeding systems. *Journal of Dairy Science*. 99: 1266 - 1276.
15. Beever, D. E.; Cammell, S. B.; Sutton, J. D.; Rowe, N.; Perrott, G. E. 1998. Energy metabolism in high yielding cows. In: *Winter Meeting of the British Society of Animal Science (35th, 1998, Pencuik)*. Proceedings. Penciuik, British Society of Animal Welfare. 13 p.
16. Bell, A. W. 1995. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of Animal Science*. 73: 2804 - 2819.
17. _____; Bauman, D. E. 1997. Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 2: 265 - 278.
18. _____; Burhans, W. S.; Overton, T. R. 2000. Protein nutrition in late pregnancy, maternal protein reserves and lactation performance in dairy cows. *Proceedings of the Nutrition Society*. 59: 119 - 126.
19. Bergsten, C. 2001. Effects of conformation and management system on hoof and leg diseases and lameness in dairy cows. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 17(1): 1 - 23.

20. Berry, D. P.; Roche, J. R.; Coffey, M. P. 2007. Body Condition Score and Fertility: More Than Just a Feeling. *In*: Royal, M. D., Friggens, N. C., Smith, R. F. eds. Fertility in Dairy Cows: Bridging the gaps. Liverpool, Liverpool Hope University. pp. 107 - 118.
21. Bjerre-Harpoth, V.; Friggens, N. C.; Thorup, V. M.; Larsen, T.; Damgaard, B. M.; Ingvarsen, K. L.; Moyes, K. M. 2012. Metabolic and production profiles of dairy cows in response to decreased nutrient density to increase physiological imbalance at different stages of lactation. *Journal of Dairy Science*. 95: 2362 - 2380.
22. Blanc, F.; Bocquier, F.; Debus, N.; Agabriel, J.; D'Hour, P.; Chilliard, Y. 2004. La pérennité et la durabilité des élevages de ruminants dépendent des capacités adaptatives des femelles. (en línea). *INRAE Productions Animales*. 17: 287 - 302. Consultado 21 abr. 2022. Disponible en <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2004.17.4.3604>.
23. Britt, J. H. 1994. Follicular development and fertility: potential effects of negative energy balance. *In*: National Reproduction Symposium (1994, Pittsburgh). Proceedings. Pittsburgh, s.e. pp. 103 - 111.
24. Brockman, R. P. 1993. Glucose and short-chain fatty acid metabolism. *In*: Forbes, J. M.; France, J. eds. Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism. Wallingford, CAB International. pp. 247 - 265.
25. Butler, J. E.; Hamilton, W. C.; Sasser, R. G.; Ruder, C. A.; Hass, G. M.; Williams, R. J. 1982. Detection and partial characterization of two bovine pregnancy specific proteins. *Biology of Reproduction*. 26: 925 - 933.
26. Butler, S. T.; Pelton, S. H.; Butler, W. R. 2004. Insulin increases 17 β -estradiol production by the dominant follicle of the first postpartum follicle wave in dairy cows. *Reproduction*. 127: 537 - 545.

27. Butler, W. R.; Smith, R. D. 1989. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 72: 767 - 783.
28. _____. 2000. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Animal Reproduction Science*. 60-61: 449 - 457.
29. _____. 2001. Nutritional Effects on Resumption of Ovarian Cyclicity and Conception Rate in Postpartum Dairy Cows. *BSAP Occasional Publication*. 26(1): 133 - 145.
30. _____. 2003. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livestock Production Science*. 83: 211 - 218.
31. Chagas, L. M.; Bass, J. J.; Blache, D.; Burke, C. R.; Kay, J. K.; Lindsay, D. R.; Lucy, M. C.; Martin, G. B.; Meier, S.; Rhodes, F. M.; Roche, J. R.; Thatcher, W. W.; Webb, R. 2007. Invited review: new perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 90: 4022 - 4032.
32. Cheng, Z.; Oguejiofor, C. F.; Swangchan-Uthai, T.; Carr, S.; Wathes, D. C. 2015. Relationships between Circulating Urea Concentrations and Endometrial Function in Postpartum Dairy Cows. (en línea). *Animals*. 5(3): 748 - 773. Consultado 21 abr. 2022. Disponible en <https://www.mdpi.com/2076-2615/5/3/382/htm>.
33. Chilibroste, P.; Soca, P.; Mattiauda, D. 2012. Estrategias de alimentación en Sistemas de Producción de Leche de base pastoril. *Cangüé*. no. 32: 2 - 8.
34. Cirio, A.; Tebot, I. 1998. Fisiología metabólica de los rumiantes. Montevideo, Universidad de la República, Facultad de Veterinaria. 141 p.
35. Clerget, E.; De Sousa, N. M.; Bella, A.; Maghuin-Rogister, G.; Beckers, J. F. 2008. Placental glycoproteins in the mammals. *Annales d'endocrinologie*. 69(1): 18 - 29.

36. Comité de Nomenclatura Reproductiva Bovina. 1972. Recommendations for standardising bovine reproductive terms. *The Cornell Veterinarian*. 62(2): 216 - 237.
37. Crowe, M. A. 2008. Resumption of ovarian cyclicity in post-partum beef and dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals*. 43(Suppl. 5): 20 - 28.
38. De Rensis, F.; Scaramuzzi, R. J. 2003. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow: a review. *Theriogenology*. 60: 1139 - 1151.
39. Delaby, L.; Faverdin, P.; Michel, G.; Disenhaus, C.; Peyraud, J. L. 2009. Effect of different feeding strategies on lactation performance of Holstein and Normande dairy cows. *Animal*. 3: 891 - 905.
40. _____.; González-Rodríguez, A.; López-Mosquera, M. E.; Leurent, S.; Gallard, E. Y.; Roca-Fernández, A. I. 2015. Efecto a largo plazo de la raza de vaca y la estrategia de alimentación sobre la producción y composición de la leche, el peso vivo y la condición corporal del ganado vacuno lechero en el sistema de pastoreo rotacional simplificado. *Pastos*. 44(1): 44 - 58.
41. Delavaud, C.; Bocquier, F.; Chilliard, Y.; Keisler, D. H.; Gertler, A.; Kann, G. 2000. Plasma leptin determination in ruminants: effect of nutritional status and body fatness on plasma leptin concentration assessed by a specific RIA in sheep. *Journal of Endocrinology*. 165: 519 - 526.
42. Dillon, P.; Buckley, F.; O'Connor, P.; Hegarty, D.; Rath, M. 2003. A comparison of different dairy cow breeds on a seasonal grass-based system of milk production: 1. Milk production, live weight, body condition score and DM intake. *Livestock Production Science*. 83: 21 - 33.

43. Diskin, M. G.; Sreenan, J. M. 1980. Fertilisation and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. *Journal of Reproduction and Fertility*. 59: 463 - 468.
44. _____; Mackey, D.; Roche, J.; Sreenan, J. 2003. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Animal Reproduction Science*. 78: 345 - 370.
45. _____; Morris, D. G. 2008. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reproduction in Domestic Animals*. 43(2): 260 - 267.
46. Djoković, R.; Cincović, M.; Belić, B.; Toholj, B.; Davidov, I.; Hristovska, T. 2015. Relationship between od metabolic hormones, metabolites and energy balance in Simmental dairy cows during peripartum period and lactation. *Pakistan Veterinary Journal*. 35(2): 163 - 167.
47. Dobson, H.; Walker, S. L.; Morris, M. J.; Routly, J. E.; Smith, R. F. 2008. Why is it getting more difficult to successfully artificially inseminate dairy cows? *Animal*. 2: 1104 - 1111.
48. Edmonson, A. J.; Lean, I. J.; Weaver, L. D.; Farver, T.; Webster, G. 1989. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 72: 68 - 78.
49. Elrod, C.; Van Amburgh, M.; Butler, W. R. 1993. Alterations of pH in response to increased dietary protein in cattle are unique to the uterus heifers. *Journal of Animal Science*. 71: 702 - 706.
50. Fenwick, M. A.; Llewellyn, S.; Fitzpatrick, R.; Kenny, D. A.; Murphy, J. J.; Patton, J.; Wathes, D. C. 2008. Negative energy balance in dairy cows is associated with specific changes in IGF-binding protein expression in the oviduct. *Reproduction*. 135: 63 - 75.

51. Ferrell, C. L.; Garrett, W. N.; Hinman, N. 1976. Growth, development, and composition of udder and gravid uterus of beef heifers during pregnancy. *Journal of Animal Science*. 42: 1477 - 1489.
52. Frenche, M. H.; Johansson, I.; Joshi, N. R.; MacLaughlin, E. A. 1968. Razas europeas de ganado bovino. (en línea). Roma, FAO. v. 2. 418 p. Consultado 25 abr. 2022. Disponible en <https://www.fao.org/3/an473s/an473s00.htm>.
53. Funston, R. N.; Larson, D. M.; Vonnahme, K. A. 2010. Effects of maternal nutrition on conceptus growth and offspring performance: Implications for beef cattle production. *Journal of Animal Science*. 88: 205 - 215.
54. Garcia, S.; Holmes, C. 2001. Lactation curves of autumn- and spring-calved cows in pasture-based dairy systems. *Livestock Production Science*. 68: 189 - 203.
55. Garnsworthy, P. C.; Sinclair, K. D.; Webb, R. 2008. Integration of physiological mechanisms that influence fertility in dairy cows. *Animal*. 2(8): 1144 - 1152.
56. _____; Fouladi-Nashta, A. A.; Mann, G. E.; Sinclair, K. D.; Webb, R. 2009. Effect of dietary-induced changes in plasma insulin concentrations during the early post partum period on pregnancy rate in dairy cows. *Reproduction*. 137: 759 - 768.
57. Garrett, J. E.; Geisert, R. D.; Zavy, M. T.; Morgan, G. L. 1988. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*. 84: 437 - 446.
58. Garverick, H. A.; Harris, M. N.; Vogel-Bluel, R.; Sampson, J. D.; Bader, J.; Lamberson, W. R.; Youngquist, R. S. 2013. Concentrations of nonesterified fatty acids and glucose in blood of periparturient dairy cows are indicative of pregnancy success at first insemination. *Journal of Dairy Science*. 96(1): 181 - 188.

59. Green, J. A.; Parks, T. E.; A Valle, M. P.; Telugu, B. P.; McLain, A. L.; Peterson, A. J.; McMillan, W.; Mathialagan, N.; Hook, R. R.; Xie, S.; Roberts, R. M. 2005. The establishment of an ELISA for the detection of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) in the serum of pregnant cows and heifers. (en línea). *Theriogenology*. 63(5): 1481 - 503. Consultado 21 abr. 2022. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.07.011>.
60. Green, J. C.; Meyer, J. P.; Williams, A. M.; Newsom, E. M.; Keisler, D. H.; Lucy, M. C. 2012. Pregnancy development from day 28 to 42 of gestation in postpartum Holstein cows that were either milked (lactating) or not milked (not lactating) after calving. *Reproduction*. 143: 699 - 711.
61. Gross, J.; Van Dorland, H.; Bruckmaier, R. M.; Schwarz, F. J. 2011. Performance and metabolic profile of dairy cows during a lactational and deliberately induced negative energy balance with subsequent realimentation. *Journal of Dairy Science*. 94: 1820 - 1830.
62. Grummer, R. R. 1995. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *Journal of Animal Science*. 73(9): 2820 - 2833.
63. Gunaretnam, I.; Pretheeban, T.; Rajamahendran, R. 2013. Effects of ammonia and urea in vitro on mRNA of candidate bovine endometrial genes. *Animal Reproduction Science*. 141: 42 - 51.
64. Gutierrez, C. G.; Gong, J. G.; Bramley, T. A.; Webb, R. 2006. Selection on the predicted breeding value for milk production delays ovulation independently of changes in follicular development milk production and body weight. *Animal Reproduction Science*. 95: 193 - 205.

65. Gutierrez-Aguilar, C. G. 1997. The effect of nutrition and metabolic hormones on follicular development in cattle. PhD Dissertation. Edinburgh, United Kingdom. University of Edinburgh. Department of Obstetrics and Gynaecology. Centre for Reproductive Biology. 239 p.
66. Hernández Cerón, J. 2017. Fisiología Clínica de la Reproducción de los Bovinos Lecheros. Ciudad de México, UNAM. 172 p.
67. Holtenius, K.; Agenäs, S.; Delavaud, C.; Chilliard, Y. 2003. Effects of feeding intensity during the dry period: 2. Metabolic and hormonal responses. *Journal of Dairy Science*. 86: 883 - 891.
68. Horan, B.; Dillon, P.; Faverdin, P.; Delaby, L.; Buckley, F.; Rath, M. 2005. The interaction of strain of Holstein-Friesian cows and pasture-based feed systems on milk yield, body weight, and body condition score. *Journal of Dairy Science*. 88: 1231 - 1243.
69. Horn, M.; Steinwigger, A.; Starz, W.; Pfister, R.; Zollitsch, W. 2014. Interactions between calving season and cattle breed in a seasonal Alpine organic and low-input dairy system. *Livestock Science*. 160: 141 - 150.
70. Hughes, A. L.; Green, J. A.; Garbayo, J. M.; Roberts, R. M. 2000. Adaptive diversification within a large family of recently duplicated, placentally-expressed genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97(7): 3319 - 3323.
71. IDEXX. 2019. ELISA Technical Guide. Westbrook, IDEXX Laboratories. 30 p.
72. INALE. MGAP (Instituto Nacional de la Leche. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, UY). 2019. Encuesta lechera 2019. (en línea). Montevideo, MGAP. Consultado may. 2022. Disponible en <https://www.inale.org/wp-content/uploads/2021/09/Resultados-Encuesta-2019-2.xlsx>.

73. Ingvarstsen, K. L.; Andersen, J. B. 2000. Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. *Journal of Dairy Science*. 83: 1573 - 1597.
74. Jeong, J. K.; Choi, I. S.; Kang, H. G.; Hur, T. Y.; Jung, Y. H.; Kim, I. H. 2015. Relationship between serum metabolites, body condition, peri- and postpartum health and resumption of postpartum cyclicity in dairy cows. *Livestock Science*. 181: 31 - 37.
75. Jorge-Smeding, E. 2017. Caracterización del ciclo productivo de vacas lecheras de dos razas contrastantes en un sistema pastoril de baja dependencia de insumos externos: aspectos productivos, fisiológicos y emisiones de metano. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 75 p.
76. _____; Astigarraga, L.; Loza, C.; Carriquiry, M.; Rico, D.; Álvarez-Oxiley, A. 2021. Characterisation of productive performance, body reserve dynamics and energy metabolic parameters of Holstein Friesian and Normande dairy cows managed in a low-input pastoral dairy system. (en línea). *Animal Production Science*. 62(3): 274 - 283. Consultado 21 abr. 2022. Disponible en <https://doi.org/10.1071/AN21250>.
77. Jorritsma, R.; César, M. L.; Hermans, J. T.; Kruitwagen, C. L.; Vos, P. L.; Kruip, T. A. 2004. Effects of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cells and developmental potential of oocytes in vitro. *Animal Reproduction Science*. 81: 225 - 235.
78. Kawashima, C.; Fukihara, S.; Maeda, M.; Kaneko, E.; Montoya, C. A.; Matsui, M.; Shimizu, T.; Matsunaga, N.; Kida, K.; Miyake, Y.; Schams, D.; Miyamoto, A. 2007. Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave post-partum in high-producing dairy cows. *Reproduction*. 133: 155 - 163.

79. Keown, J. F.; Everett, R. W.; Empet, N. B.; Wadell, L. H. 1986. Lactation curves. *Journal of Dairy Science*. 69: 769 - 781.
80. Kessel, S.; Stroehl, M.; Meyer, H. H. D.; Hiss, S.; Sauerwein, H.; Schwarz, F. J.; Bruckmaier, R. M. 2008. Individual variability in physiological adaptation to metabolic stress during early lactation in dairy cows kept under equal conditions. *Journal of Animal Science*. 86: 2903 - 2912.
81. Kim, I. H.; Suh, G. H. 2003. Effect of the amount of body condition loss from the dry to near calving periods on the subsequent body condition change, occurrence of postpartum diseases, metabolic parameters and reproductive performance in Holstein dairy cows. *Theriogenology*. 60(8): 1445 - 1456.
82. Kiracofe, G. H.; Wright, J. M.; Schalles, R. R.; Ruder, C. A.; Parroquia, S.; Sasser, R. G. 1993. Pregnancy-specific protein B in serum of postpartum beef cows. *Journal of Animal Science*. 71(8): 2199 - 2205.
83. Klisch, K.; De Sousa, N. M.; Beckers, J. F.; Leiser, R.; Pich, A. 2005. Pregnancy associated glycoprotein-1, -6, -7, and -17 are major products of bovine binucleate trophoblast giant cells at midpregnancy. *Molecular Reproduction and Development*. 71(4): 453 - 460.
84. Knight, C. 2001. Lactation and gestation in dairy cows: flexibility avoids nutritional extremes. *Proceedings of the Nutrition Society*. 60(4): 527 - 537.
85. Kolver, E. S.; Muller, L. D. 1998. Performance and Nutrient Intake of High Producing Holstein Cows Consuming Pasture or a Total Mixed Ration. *Journal of Dairy Science*. 81: 1403 - 1411.
86. Kruij, T. A. M.; Kemp, B. 1999. Voeding en vruchtbaarheid bij landbouwhuisdieren. *Tijdschr Diergeneeskd*. 124: 462 - 467.

87. Landau, S.; Braw-Tal, R.; Kaim, M.; Bor, A.; Bruckental, I. 2000. Preovulatory follicular status and diet affect the insulin and glucose content of follicles in high-yielding dairy cows. *Animal Reproduction Science*. 64: 181 - 197.
88. Le Guillou, S.; Leduc, A.; Laubier, J. 2019. Characterization of Holstein and Normande whole milk miRNomes highlights breed specificities. (en línea). *Scientific Reports*. 9: 20345. Consultado 6 may. 2022. Disponible en <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56690-7>.
89. LeBlanc, S. J. 2010. Assessing the association of the level of milk production with reproductive performance in dairy cattle. *Journal of Reproduction and Development*. 56(Suppl. 1): S1 - S7.
90. Leroy, J. L.; Opsomer, G.; De Vliegher, S.; Vanholder, T.; Goossens, L.; Geldhof, A.; Bols, P. E. J.; De Kruif, A.; Van Soom, A. 2005a. Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows. *Theriogenology*. 64: 2022 - 2036.
91. _____; Vanholder, T.; Mateusen, B.; Christophe, A.; Opsomer, G.; De Kruif, A.; Genicot, G.; Van Soom, A. 2005b. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. *Reproduction*. 130: 485 - 495.
92. _____; Opsomer, G.; Van Soom, A.; Goovaerts, I. G.; Bols, P. E. 2008a. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger?: Part I. The importance of negative energy balance and altered corpus luteum function to the reduction of oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. *Reproduction of Domestic Animals*. 43: 612 - 622.

93. _____; Vanholder, T.; Van Knegsel, A. T.; Garcia-Ispuerto, I.; Bols, P. E. 2008b. Nutrient prioritization in dairy cows early postpartum: Mismatch between metabolism and fertility. *Reproduction in Domestic Animals*. 43: 96 - 103.
94. Lonergan, P. 2010. Using basic approaches to address problems in dairy reproduction. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*. 67: 377 - 386.
95. Lopez, H.; Satter, L. D.; Wiltbank, M. C. 2004. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science*. 81: 209 - 223.
96. López-Gatius, F.; Garbayo, J. M.; Santolaria, P.; Yániz, J.; Ayad, A.; De Souza, N. M.; Beckers, J. F. 2007. Milk production correlates negatively with plasma levels of pregnancy-associated glycoprotein (PAG) during the early fetal period in high producing dairy cows with live fetuses. *Domestic Animal Endocrinology*. 32(1): 29 - 42.
97. Lucy, M. C.; Staples, C. R.; Michel, F. M.; Thatcher, W. W. 1991. Energy balance and size and number of ovarian follicles detected by ultrasonography in early postpartum dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 74: 473 - 482.
98. _____. 2001. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *Journal of Dairy Science*. 84: 1277 - 1293.
99. _____.; Jiang, H.; Kobayashi, Y. 2001. Changes in the somatotropin axis associated with the initiation of lactation. (en línea). *Journal of Dairy Science*. 84(Suppl.): E113 - E119. Consultado may. 2022. Disponible en [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)70205-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)70205-6).

100. _____. 2008. Functional differences in the growth hormone and insulin-like growth factor axis in cattle and pigs: implications for postpartum nutrition and reproduction. *Reproduction of Domestic Animals*. 43(Suppl. 2): 31 – 39.
101. _____. 2009. Celo: biología básica y mejoramiento de la detección. (en línea). Argentina, s.e s.p. Consultado 5 may. 2022. Disponible en https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/161-celo_biologia.pdf.
102. Lussier, J. G.; Matton, P.; Dufour, J. J. 1987. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *Journal of Reproduction and Fertility*. 81: 301 - 307.
103. McEvoy, T. G. 1997. Dietary excesses of urea influence the viability and metabolism of preimplantation sheep embryos and may affect fetal growth among survivors. *Animal Reproduction Science*. 47: 71 - 90.
104. McGuire, M. A.; Vicini, J. L.; Bauman, D. E.; Veenhuizen, J. J. 1992. Insulin-like growth factors and binding proteins in ruminants and their nutritional regulation. *Journal of Animal Science*. 70: 2901 - 2910.
105. Meikle, A.; Kulesar, M.; Chilliard, Y.; Febel, H.; Delavaud, C.; Cavestany, D.; Chilibroste, P. 2004. Effects of parity and body condition at parturition on endocrine and reproductive parameters of the cow. *Reproduction*. 127: 727 - 737.
106. _____.; Adrien, M. L.; Mattiauda, D. A.; Chilibroste, P. 2013. Effect of sward condition on metabolic endocrinology during the early postpartum period in primiparous grazing dairy cows and its association with productive and reproductive performance. *Animal Feed Science and Technology*. 186: 139 - 147.

107. Melendez, P.; Donovan, A.; Hernandez, J.; Barolome, J.; Risco, C. A.; Staples, C.; Thatcher W. W. 2003. Milk, plasma, and blood urea nitrogen concentrations, dietary protein, and fertility in dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 223: 628 - 634.
108. Mercadante, P. M.; Ribeiro, E. S.; Risco, C.; Ealy, A. D. 2016. Associations between pregnancy-associated glycoproteins and pregnancy outcomes, milk yield, parity, and clinical diseases in high-producing dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 99(4): 3031 - 3040.
109. MGAP. DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección de Investigaciones Estadísticas Agropecuarias, UY). 2020. Anuario estadístico agropecuario 2020. (en línea). Montevideo. 243 p. Consultado mar. 2022. Disponible en <https://descargas.mgap.gub.uy/OPYPA/Anuarios/anuario2020/anuario2020.pdf>.
110. Mialon, M. M.; Camous, S.; Renand, G.; Martal, J.; Ménessier, F. 1993. Peripheral concentrations of a 60-kDa pregnancy serum protein during gestation and after calving and in relationship to embryonic mortality in cattle. *Reproduction Nutrition Development*. 33(3): 269 - 282.
111. Moore, D. A.; Varga, G. 1996. BUN and MUN: Urea nitrogen testing in dairy cattle. *Compendium*. 18: 712 - 720.
112. Mottram, T. 2016. Animal board invited review: Precision livestock farming for dairy cows with a focus on oestrus detection. *Animal*. 10: 1575 - 1584.
113. Naya, H.; Urioste, J. I.; Chilibroste, P. 2001. Evaluación cuantitativa de curvas de lactancia de vacas Holando en Uruguay: II. Ajuste de un modelo bifásico. *In*: Congreso de la Asociación Argentina de Producción Animal (24°, 2002, Rafaela). Resúmenes. Rafaela, Asociación Argentina de Producción Animal. p. irr.

114. Nebel, R. L.; McGilliard, M. L. 1993. Interactions of high milk yield and reproductive performance in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 76: 3257 - 3268.
115. Ntallaris, T.; Humblot, P.; Båge, R.; Sjunnesson, Y.; Dupont, J.; Berglund, B. 2017. Effect of energy balance profile on metabolic and reproductive response in Holstein and Swedish Red cows. *Theriogenology*. 90: 276 - 283.
116. O'Callahan, D.; Lozano, J. M.; Fahey, J.; Gath, V.; Snijders, S.; Boland M. P. 2001. Relationships Between Nutrition and Fertility in Cattle. *British Society of Animal Science Occasional Publication*. 26: 147 - 160.
117. Ohkura, S.; Ichimaru, T.; Itoh, F.; Matsuyama, S.; Okamura, H. 2004. Further evidence for the role of glucose as a metabolic regulator of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in goats. *Endocrinology*. 145: 3239 - 3246.
118. Opsomer, G.; Coryn, M.; Deluyker, H.; De Kruif, A. 1998. An analysis of ovarian dysfunction in high yielding dairy cows after calving based on progesterone profiles. *Reproduction in Domestic Animals*. 33: 193 - 204.
119. Ospina, P. A.; Nydam, D. V.; Skokol, T.; Overton, T. R. 2010. Evaluation of nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. *Journal of Dairy Science*. 93: 546 - 554.
120. _____.; McArt, J. A.; Overton, T. R.; Stokol, T.; Nydam, D. V. 2013. Using nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate concentrations during the transition period for herd-level monitoring of increased risk of disease and decreased reproductive and milking performance. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 29(2): 387 - 412.

121. Overton, T. R.; Waldron, M. R. 2004. Nutritional management of transition dairy cows: strategies to optimize metabolic health. (en línea). *Journal of Dairy Science*. 87: E105 - E119. Consultado may. 2022. Disponible en [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)70066-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)70066-1).
122. Patel, O. V.; Sulon, J.; Beckers, J. F.; Takahashi, T.; Hirako, M.; Sasaki, N. 1997. Plasma bovine Pregnancy-associated glycoprotein concentration throughout gestation in relationship to fetal number in cow. *European Journal of Endocrinology*. 137(4): 423 - 428.
123. Pembleton, K. G.; Hills, J. L.; Freeman, M. J.; McLare, D. K.; French, M.; Rawnsley, R. P. 2016. More milk from forage; milk production, blood metabolites, and forage intake of dairy cows grazing pasture mixtures and spatially adjacent monocultures. *Journal of Dairy Science*. 99: 3512 - 3528.
124. Pereira, I.; Laborde, D.; Carriquiry, M.; López-Villalobos, N.; Meikle, A. 2010a. Blood metabolic profiles in Uruguayan Holstein and Uruguayan Holstein x New Zealand Holstein-Friesian dairy cows. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*. 70: 311 - 315.
125. _____.; _____.; _____.; _____. 2010b. Productive and reproductive performance of Uruguayan Holstein and Uruguayan Holstein x New Zealand Holstein Friesian cows in a predominantly pasturebased system. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*. 70: 306 - 310.
126. Perényi, Z. S.; Szenci, O.; Sulon, J.; Drion, P. V.; Beckers, J. F. 2002. Comparison of the ability of three radioimmunoassay to detect pregnancy-associated glycoproteins in bovine plasma. *Reproduction in Domestic Animals*. 37(2): 100 - 104.

127. Perry, G. A.; Perkins, S. D.; Northrop, E. J.; Rich, J. J. J.; Epperson, K. M.; Andrews, T. N.; Kline, A. C.; Quail, L. K.; Walker, J. A.; Wright, C. L.; Russell, J. R. 2021. Impact of trace mineral source on beef replacement heifer growth, reproductive development, and biomarkers of maternal recognition of pregnancy and embryo survival. *Journal of Animal Science*. 99(7): 1 - 8.
128. Petrera, F.; Napolitano, F.; Dal Prà, A.; Abeni, F. 2015. Plasma parameters related to energy and lipid metabolism in periparturient Modenese and Italian Friesian cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 99: 962 - 973.
129. Piccioli-Cappelli, F.; Looor, J. J.; Seal, C. J.; Minuti, A.; Trevisi, E. 2014. Effect of dietary starch level and high rumen-undegradable protein on endocrinometabolic status, milk yield, and milk composition in dairy cows during early and late lactation. *Journal of Dairy Science*. 97: 7788 - 7803.
130. Pires, J. A. A.; Chilliard, Y.; Delavaud, C.; Rouel, J.; Pomiès, D.; Blanc, F. 2015. Physiological adaptations and ovarian cyclicity of Holstein and Montbéliarde cows under two low-input production systems. *Animal*. 9: 1986 - 1995.
131. Pryce, J. E.; Coffey, M. P.; Simm, G. 2001. The relationship between body condition score and reproductive performance. *Journal of Dairy Science*. 84: 1508 - 1515.
132. Pushpakumara, P. G.; Robinson, R. S.; Demmers, K. J.; Mann, G. E.; Sinclair, K. D.; Webb, R.; Wathes, D. C. 2002. Expression of the insulin-like growth factor (IGF) system in the bovine oviduct at oestrus and during early pregnancy. *Reproduction*. 123: 859 - 868.
133. Reiche, A.; Delaby, L.; Colette, S.; Gallard, Y. 2015. Quelle vache laitière pour quel système? Influence du type de vaches et du niveau des apports nutritifs sur les eperformances des vaches laitières: Cas particulier des primipares. *Mémoire Ing. Agr. Paris, France. AgroCampus Ouest et INRA de Rennes*. 20 p.

134. Rhoads, M. L.; Gilbert, R. O.; Lucy, M. C.; Butler, W. R. 2004. Effects of urea infusion on the uterine luminal environment of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 87: 2896 - 2901.
135. Ricci, A.; Carvalho, P. D.; Amundson, M. C.; Fourdraine, R. H.; Vincenti, L.; Fricke, P. M. 2015. Factors associated with pregnancy-associated glycoprotein (PAG) levels in plasma and milk of Holstein cows during early pregnancy and their effect on the accuracy of pregnancy diagnosis. *Journal of Dairy Science*. 98(4): 2502 - 2514.
136. Robinson, R. S.; Hammond, A. J.; Wathes, D. C.; Hunter, M. G.; Mann, G. E. 2008. Corpus luteum–endometrium–embryo interactions in the dairy cow: underlying mechanisms and clinical relevance. *Reproduction in Domestic Animals*. 43(Suppl. 2): 104 - 112.
137. Roche, J. F. 2006. The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. *Animal Reproduction Science*. 96: 282 - 296.
138. Roche, J. R.; Berry, D. P.; Kolver, E. S. 2006. Holstein-Friesian strain and feed effects on milk production, body weight, and body condition score profiles in grazing dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 89: 3532 - 3543.
139. _____; MacDonald, K. A.; Burke, C. R.; Lee, J. M.; Berry, D. P. 2007. Associations among body condition score, body weight, and reproductive performance in seasonal-calving dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 90: 376 - 391.
140. _____; Friggens, N. C.; Kay, J. K.; Fisher, M. W.; Stafford, K. J.; Berry, D. P. 2009. Invited review: body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *Journal of Dairy Science*. 92: 5769 - 5801.

141. Rodriguez-Cutzal, L. X.; Burke, J. L.; Correa-Luna, M.; Lopez-Villalobos, N. 2021. A statistical evaluation of associations between reproductive performance and milk composition and animal factors on grazing dairy cows in two New Zealand dairy farms. *New Zealand Veterinary Journal*. 70(3): 138 - 148.
142. Roelofs, J.; Lopez-Gatius, F.; Hunter, R. H. F.; Van Eerdenburg, F. J. C. M.; Hanzen, C. 2010. When is a cow in estrus?: Clinical and practical aspects. *Theriogenology*. 74: 327 - 344.
143. Rojas-Canadas, E.; Herlihy, M. M.; Kenneally, J.; Grant, J.; Kearney, F.; Lonergan, P.; Butler, S. T. 2020. Associations between postpartum phenotypes, cow factors, genetic traits, and reproductive performance in seasonal-calving, pasture-based lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 103(1): 1016 - 1030.
144. Roseler, D. K.; Ferguson, J. D.; Sniffen, C. J.; Herrema, J. 1993. Dietary-Protein degradability effects on plasma and milk urea nitrogen and milk non protein nitrogen in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 76: 525 - 534.
145. Rovere, G.; Sotelo, F.; Valena, J.; Slavica, J. 2007. Mejoramiento Lechero y el monitoreo reproductivo de los tambos uruguayos. In: Congreso Holstein de las Américas (9º., 2007, Colonia). Trabajos presentados. s.n.t. s.p.
146. Rowlands, G. J.; Russell, A. M.; Williams, L. A. 1985. Effects of stage of lactation, month, age, origin and heart girth on lameness in dairy cattle. *Veterinary Record*. 117: 576 - 580.
147. Royal, M. D.; Flint, A. P.; Woolliams, J. A. 2002. Genetic and phenotypic relationship among endocrine and traditional fertility traits and production traits in Holstein-Friesian dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 85: 958 - 967.

148. Sanín, Y. L.; Estrada, J. G.; Carrillo, D.; Osorio, N. R. 2014. Desarrollo fetal, Gestación y parto en la vaca. In: Sanín, Y. L. ed. Reproducción de la vaca manual didáctico sobre la reproducción, gestación, lactancia y bienestar de la hembra bovina. Medellín, Universidad de Antioquia. pp. 97 - 129.
149. Santos D. J.; Cole, J. B.; Null, D. J.; Byrem, T. M.; Ma, L. 2018. Genetic and nongenetic profiling of milk pregnancy-associated glycoproteins in Holstein cattle. *Journal of Dairy Science*. 101(11): 9987 - 10000.
150. Sartori, R.; Sartor-Bergfelt, R.; Mertens, S. A.; Guenther, J. N.; Parrish, J. J.; Wiltbank, M. C. 2002. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *Journal of Dairy Science*. 85: 2803 - 2812.
151. _____.; Bastos, M. R.; Wiltbank, M. C. 2010. Factors affecting fertilisation and early embryo quality in single- and superovulated dairy cattle. *Reproduction Fertility and Development*. 22: 151 - 158.
152. Sasser, R. G.; Ruder, C. A.; Ivani, K. A.; Butler, J. E.; Hamilton, W. C. 1986. Detection of pregnancy by radioimmunoassay of a novel pregnancy-specific protein in serum of cows and a profile of serum concentrations during gestation. *Biology of Reproduction*. 35: 936 - 942.
153. Schmidt, G. H.; Van Vleck, L. D.; Hutjens, M. F. 1984. Principles of dairy science. 2nd. ed. New Jersey, Prentice-Hall. 466 p.
154. Senger, P. L. 2003. Pathways to pregnancy and parturition. 2° rev. ed. Washington, Current Conceptions. 381 p.

155. Serrano, B.; López-Gatiús, F.; Santolaria, P.; Almería, S.; García-Ispuerto, I.; Bech-Sabat, G.; Sulon, J.; De Sousa, N. M.; Beckers, J. F.; Yániz, J. L. 2009. Factors Affecting Plasma Pregnancy-associated Glycoprotein 1 Concentrations Throughout Gestation in High-producing Dairy Cows. *Reproduction in Domestic Animals*. 44: 600 - 605.
156. Shahin, M.; Friedrich M.; Gauly, M.; Holtz, W. 2014. Pregnancy-associated glycoprotein (PAG) profile of Holstein-Friesian cows as compared to dual-purpose and beef cows. *Reproduction in Domestic Animals*. 49: 618 - 620.
157. Shehab-El-Deen, M. A.; Leroy, J. L.; Fadel, M. S.; Saleh, S. Y.; Maes, D.; Van Soom, A. 2010. Biochemical changes in the follicular fluid of the dominant follicle of high producing dairy cows exposed to heat stress early post-partum. *Animal Reproduction Science*. 117: 189 - 200.
158. Sousa, M. N.; Zongo, M.; Pitala, W.; Boly, H.; Sawadogo, L.; Sanon, M.; de Figueiredo, R.; Goncalves, P. B. D.; El Amiri, B.; Perényi, Z. 2003. Pregnancy-associated glycoprotein concentrations during pregnancy and the postpartum period in Azawak Zebu cattle. *Theriogenology*. 59: 1131 - 1142.
159. Spencer, T. E.; Sandra, O.; Wolf, E. 2008. Genes involved in conceptus–endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. *Reproduction*. 135: 165 - 179.
160. Sreenan, J. M.; Diskin, M. G. 1983. Early embryonic mortality in the cow: its relationship with progesterone concentration. *Veterinary Record*. 112: 517 - 521.
161. Szenci, O.; Beckers, J. F.; Humblot, P.; Sulon, J.; Sasser, G.; Taverne, M. A.; Varga, J.; Baltusen, R.; Schekk, G. 1998. Comparison of ultrasonography, bovine pregnancy-specific protein B, and bovine pregnancy-associated glycoprotein 1 tests for pregnancy detection in dairy cows. *Theriogenology*. 50(1): 77 - 88.

162. Taylor, V. J.; Beever, D. E.; Bryant, M. J.; Wathes, D. C. 2003. Metabolic profiles and progesterone cycles in first lactation dairy cows. *Theriogenology*. 59: 1661 - 1677.
163. _____.; _____.; Wathes, D. C. 2004. Physiological adaptations to milk production that affect fertility in high yielding dairy cows. *British Society of Animal Science*. no. 29: 37 - 71.
164. Telugu, B. P.; Walker, A. M.; Green, J. A. 2009. Characterization of the bovine pregnancy-associated glycoprotein gene family – analysis of gene sequences, regulatory regions within the promoter and expression of selected genes. (en línea). *BMC Genomics*. 10: 185. Consultado may. 2022. Disponible en <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-185>.
165. Thatcher, W. W.; Wilcox, C. J. 1973. Postpartum estrus as an indicator of reproductive status in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 56: 608 - 610.
166. _____.; Meyer, M. D.; Danet-Desnoyers, G. 1995. Maternal recognition of pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility*. 49: 15 - 28.
167. Tiplady, K. M.; Trinh, M. H.; Davis, S. R.; Sherlock, R. G.; Spelman, R. J.; Garrick, D. J.; Harris, B. L. 2022. Pregnancy status predicted using milk mid-infrared spectra from dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 105: 3615 - 3632.
168. Touzard, E.; Reinaud, P.; Dubois, O.; Guyader-Joly, C.; Humblot, P.; Ponsart, C.; Charpigny, G. 2013. Specific expression patterns and cell distribution of ancient and modern PAG in bovine placenta during pregnancy. *Reproduction*. 146: 347 - 362.
169. Valadão, L.; Moreira da Silva, H.; Moreira da Silva, F. 2019. Bovine Embryonic Development to implantation. *In*: Wu, B.; Feng, H. L. eds. *Embryology: Theory and Practice*. Londres, IntechOpen. p. irr.

170. Vanholder, T.; Leroy, J. L.; Dewulf, J.; Duchateau, L.; Coryn, M.; De Kruif, A. 2005a. Hormonal and metabolic profiles of high-yielding dairy cows prior to ovarian cyst formation or first ovulation post partum. *Reproduction in Domestic Animal*. 40: 460 - 469.
171. _____.; _____.; Van Soom, A.; Opsomer, G.; Maes, D.; Coryn, M.; de Kruif, A. 2005b. Effect of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cell steroidogenesis and proliferation in vitro. *Animal Reproduction Science*. 87: 33 - 44.
172. _____.; _____.; _____.; Maes, D.; Coryn, M.; Fiers, T.; De Kruif, A.; Opsomer, G. 2006. Effect of nonesterified fatty acids on bovine theca cell steroidogenesis and proliferation in vitro. *Animal Reproduction Science*. 92: 51 - 63.
173. Wallace, J. M.; Aitken, R. P.; Cheyne, M. A.; Humblot, P. 1997. Pregnancy-specific protein B and progesterone concentrations in relation to nutritional regimen, placental mass and pregnancy outcome in growing adolescent ewes carrying singleton fetuses. *Reproduction*. 109(1): 53 - 58.
174. Wallace, R. M.; Pohler, K. G.; Smith, M. F.; Green, J. A. 2015. Placental PAGs: gene origins, expression patterns and use as markers of pregnancy. *Reproduction*. 149: 115 - 126.
175. Walsh, S. W.; Buckley, F.; Pierce, K.; Byrne, N.; Patton, J.; Dillon, P. 2008. Effects of breed and feeding system on milk production, body weight, body condition score, reproductive performance, and postpartum ovarian function. *Journal of Dairy Science*. 91: 4401 - 4413.
176. _____.; Williams, E. J.; Evans, A. C. O. 2011. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Animal Reproduction Science*. 123: 127 - 138.

177. Wathes, D. C.; Wooding, F. B. 1980. An electron microscopic study of implantation in the cow. *American Journal of Anatomy*. 159(3): 285 - 306.
178. _____; Cheng, Z.; Bourne, N.; Taylor, V. J.; Coffey, M. P.; Brotherstone, S. 2007a. Differences between primiparous and multiparous dairy cows in the inter-relationships between metabolic traits, milk yield and body condition score in the periparturient period. *Domestic Animal Endocrinology*. 33(2): 203 - 225.
179. _____; Bourne, N.; Cheng, Z.; Mann, G. E.; Taylor, V. J.; Coffey, M. P. 2007b. Multiple correlation analyses of metabolic and endocrine profiles with fertility in primiparous and multiparous cows. *Journal of Dairy Science*. 90: 1310 - 1325.
180. _____; Fenwick, M.; Cheng, Z.; Bourne, N.; Llewellyn, S.; Morris, D. G.; Kenny, D.; Murphy, J.; Fitzpatrick; R. 2007c. Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. *Theriogenology*. 68(1): S232 - S241.
181. _____; Cheng, Z.; Fenwick, M. A.; Fitzpatrick, R.; Patton, J. 2011. Influence of energy balance on the somatotrophic axis and metalloproteinase expression in the endometrium of the post-partum dairy cow. *Reproduction*. 141: 269 - 281.
182. Wiebold, J. L. 1988. Embryonic mortality and the uterine environment in first-service lactating dairy cows. *Journal of Reproduction Fertility*. 84: 393 - 399.
183. Wiltbank, M.; Lopez, H.; Sartori, R.; Sangsritavong, S.; Gümen, A. 2006. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology*. 65: 17 - 29.
184. Wood, P. D. P. 1967. Algebraic model of the lactation curve in cattle. *Nature*. 216: 164 - 165.
185. _____. 1972. A note on seasonal fluctuations in milk production. *Animal Production*. 15: 89 - 92.

186. Wooding, F. B.; Roberts, R. M.; Green, J. A. 2005. Light and electron microscope immunocytochemical studies of the distribution of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) throughout pregnancy in the cow: possible functional implications. *Placenta*. 26: 807 - 827.
187. Xie, S. C.; Low, B. G.; Nagel, R. J.; Kramer, K. K.; Anthony, R. V.; Zoli, A. P.; Beckers, J. F.; Roberts, R. M. 1991. Identification of the major pregnancy-specific antigens of cattle and sheep as inactive members of the aspartic proteinase family. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 88(22): 10247 - 10251.
188. Yan, T.; Mayne, C. S.; Keady, T. W. J.; Agnew, R. E. 2006. Effects of dairy cow genotype with two planes of nutrition on energy partitioning between milk and body tissue. *Journal of Dairy Science*. 89: 1031 - 1042.
189. Zoli, A. P.; Beckers, J. F.; Wouters-Ballman, P.; Closset, J.; Falmagne, P.; Ectors, F. 1991. Purification and characterization of a bovine Pregnancy-Associated Glycoprotein. *Biology of Reproduction*. 45: 1 - 10.
190. _____; Guilbault, L. A.; Delahaut, P.; Benitez-Ortiz, W.; Beckers, J. F. 1992. Radioimmunoassay of a bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum: its application in pregnancy diagnosis. *Biology of Reproduction*. 46: 83 - 92.

12. ANEXOS

En la tabla 1 se aprecia el número de pastoreos y la oferta de forraje conservado y afrechillo de arroz

Tabla 1. Pastoreos diarios y oferta de forraje conservado y afrechillo de arroz durante el experimento*.

Fecha	Pastoreos		Ensilaje (kg MS/vaca/d)	Heno (kg MS/vaca/d)	Af. Arroz (kg MS /vaca/ordeño)
	No.	pastura			
28/3/2016	2	cebadilla			1.3
22/4/2016			6	7	1.3
2/5/2016	1	avena	6		1.8
17/5/2016	1	pp 3er. año (festuca+TB+lotus)	6	3.5	1.8
31/5/2016	1	avena	6		2.2
7/8/2016	1	avena		7	2.2
13/8/2016	1	pp 2°. año (cebadilla + TR)		7	2.2
25/8/2016	2	avena			2.2
28/9/2016	2	pp 3er. año (festuca+TB+lotus)			1.8
18/10/2016	2	pp 2°. año (cebadilla + TR)			1.3
27/10/2016	2	pp 3er. año (festuca+TB+lotus)			1.3
15/11/2016	2	pp 2°. año (cebadilla + TR)			1.3
29/11/2016	2	pp 4°. año (alfalfa + TB+Pasp+Dact)			1.3
13/12/2016	2	pp 3er. año festuca+TB+lotus			1.3
7/1/2017	2	Sorgo forrajero			1.3

*: la oferta en MS de forraje conservado y afrechillo de arroz están estimadas a partir de la oferta en MF y resultados de % MS según Cozzolino et al. (1994). pp: pradera permanente; Cebadilla: *Bromus auleticus*; Avena: *Avena bizantina*; alfalfa: *Medicago sativa*; Lotus: *Louts cornicolatus*; Festuca: *Festuca arundinaceae*; Dact: *Dactilys glomerata*; TB: *Trifolium repens*; TR: *Trifolium pratense*; Pasp: *Paspalum dilatatum*; Sorgo forrajero: *Sorghum vulgare*.