



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**UTILIZACIÓN DEL GRANO DE SORGO EN BOVINOS Y  
OVINOS**

**Efecto de la Especie Animal, del Nivel de Inclusión en la Dieta y de  
Tratamientos Aplicados sobre el Grano**

**MARTÍN AGUERRE ANTÍA**

**TESIS DE DOCTORADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

**URUGUAY  
2015**





**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**UTILIZACIÓN DEL GRANO DE SORGO EN BOVINOS Y  
OVINOS**

**Efecto de la Especie Animal, del Nivel de Inclusión en la Dieta y de  
Tratamientos Aplicados sobre el Grano**

**MARTÍN AGUERRE ANTÍA**

**José Luis Repetto, Prof. PhD  
Director de Tesis**

**Cecilia Cajarville, Prof. PhD  
Co-director de Tesis**

**2015**

## **INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS**

**Pablo Chilibroste; Ing. Agr., PhD**  
Departamento de Producción Animal y Pasturas  
E.E.M.A.C, Facultad de Agronomía  
Universidad de la República – Uruguay

**Darío Colomatto; Ing. Agr., PhD**  
Departamento de Producción Animal  
Facultad de Agronomía  
Universidad de Buenos Aires – Argentina

**Cristina Cabrera; Ing. Agr., PhD**  
Departamento de Producción Animal y Pasturas  
Facultad de Agronomía  
Universidad de la República – Uruguay

# **ACTA DE DEFENSA DE TESIS**

# **INFORME DEL TRIBUNAL**

*“Si no conozco una cosa, la investigaré.”*

*Louis Pasteur (1822-1895)*  
*Químico y microbiólogo francés.*

*“En verdad no puedes crecer y desarrollarte si sabes las respuestas antes que las preguntas.”*

*Wayne W. Dyer (1940-?)*  
*Escritor estadounidense.*

*A Caro y Joaco...*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Caro, por su aporte académico a la realización de este trabajo, pero fundamentalmente por hacerme feliz y mostrarme las cosas realmente importantes de la vida, por su mixtura perfecta de esposa, madre y amiga y por darme lo más grande que tengo en la vida...nuestro hijo Joaquín.

A Joaco, no tengo palabras para expresar lo que siento...

A mi familia, por estar y acompañarme siempre, por compartir conmigo mis éxitos y alegrías y apoyarme en mis fracasos y tristezas.

A Joselo y Cecilia, por su orientación y enseñanzas, por cimentar en gran parte lo que soy como profesional.

A Mariana Carriquiry, Ana Laura Astessiano y Gilberto V. Kozloski, por su orientación y aportes en la escritura de las publicaciones.

A Mauro Torterolo, por su invaluable ayuda en la realización de los protocolos del Experimento 3.

A la barra de Bovinos y Nutrición: Álvaro, Germán, Alejandro, Analía, Coco, Nicolle, Maxi y Ale Britos, por su ayuda y apoyo.

A “mis tesistas” Agustín Artegoytia, Alvaro González, Andrés Cabrera, Cecilia Acosta, Giorella Pinaccio, Gustavo Persak, Ignacio Cuitiño, Leandro Assandri, Magali Audi, Marcos Urrestarazú, Mariana Alcántara, Mauro Minteguiaga, Rafael Vera, Renato Araújo, Rosina Carbone y Vanesa Machado, por la invaluable ayuda en la realización de este trabajo.

A Elena de Torres y todos los funcionarios del Campo Experimental N°2 de Libertad, por su disposición y ayuda en los trabajos de campo.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por la beca para la realización de este Doctorado (ANII; BE\_POS\_2010\_2465).

A todos ustedes, MUCHAS GRACIAS.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

	página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.....	5
2.1. Diferencias en la utilización digestiva de la dieta entre bovinos y ovinos	5
2.2. Suplementación con granos a rumiantes consumiendo pasturas templadas de buena calidad	7
2.2.1. Efecto de la suplementación sobre el consumo	7
2.2.2. Efecto de la suplementación sobre la digestibilidad de la Materia Orgánica y de la Fibra de la dieta	9
2.2.3. Efecto de la suplementación sobre el ambiente ruminal	10
2.2.4. Efecto de la suplementación sobre la síntesis de proteína microbiana y su eficiencia en rumen	11
2.2.5. Efecto de la suplementación sobre parámetros metabólicos y la expresión hepática de genes vinculados al metabolismo de la glucosa	12
2.3. El grano de sorgo como suplemento para rumiantes	14
2.3.1. Generalidad de los granos de cereales	14
2.3.2. Particularidades del grano de sorgo	15
2.3.3. Tratamientos para incrementar el valor nutritivo del grano de sorgo	16
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
4. HIPÓTESIS.....	19
5. OBJETIVOS.....	19
6. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN.....	20
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
7.1. Diseño experimental y muestreos.....	21
7.1.1. Experimentos I y II.....	21
7.1.2. Experimento III.....	23
7.2. Procedimientos y determinaciones.....	24
7.2.1. Experimento I.....	24
7.2.2. Experimento II.....	25
7.2.3. Experimento III.....	26

	página
7.3. Análisis de laboratorio.....	27
7.4. Análisis estadístico.....	28
7.4.1. Experimento I.....	28
7.4.2. Experimento II.....	29
7.4.3. Experimento III.....	29
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
8.1. Experimento I	
8.1.1. Resultados.....	30
8.1.2. Discusión.....	33
8.2. Experimento II	
8.2.1. Resultados.....	35
8.2.2. Discusión.....	38
8.3. Experimento III	
8.3.1. Resultados.....	41
8.3.2. Discusión.....	43
9. CONCLUSIONES E IMPLICANCIAS.....	46
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
11. ANEXO.....	55

## ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

	página
<b>Cuadro 1:</b> Composición química de la pastura y el grano de sorgo ( <i>Experimento I</i> )	22
<b>Cuadro 2:</b> Composición química y concentración de energía metabólica de las dietas consumidas por bovinos y ovinos ( <i>Experimento II</i> )	23
<b>Cuadro 3:</b> Composición química de las muestras de grano de sorgo ( <i>Experimento III</i> )	24
<b>Cuadro 4:</b> Primers usados para la amplificación específica del ADNc del receptor de insulina ( <i>INSR</i> ), de la <i>piruvato carboxilasa (PC)</i> , de la <i>fosfoenolpiruvato carboxikinasa (PCK1)</i> y de la <i>hipoxantina fosforribosiltransferasa (HPRT)</i> ( <i>Experimento II</i> )	25
<b>Cuadro 5:</b> Consumo y digestibilidad de bovinos y ovinos consumiendo una pastura templada y suplementada con grano de sorgo molido a razón de 0, 5, 10 y 15 g/kg de su PV (S0, S05, S10 y S15, respectivamente)	31
<b>Cuadro 6:</b> pH, concentración de AGV totales, proporción de acetato, propionato y butirato en los AGV totales, relación acetato/propionato, concentración de N-NH <sub>3</sub> , síntesis y eficiencia de síntesis de proteína microbiana en rumen de bovinos y ovinos consumiendo una pastura templada y suplementada con grano de sorgo molido a razón de 0, 5, 10 y 15 g/kg de su PV (S0, S05, S10 y S15, respectivamente)	32
<b>Cuadro 7:</b> Concentración plasmática de glucosa, insulina y glucagón y concentración hepática de ARNm del receptor de insulina ( <i>INSR</i> ), de la <i>piruvato carboxilasa (PC)</i> y de la <i>fosfoenolpiruvato carboxikinasa (PCK1)</i> en bovinos consumiendo una pastura templada fresca y suplementados o no con grano de sorgo molido	36
<b>Cuadro 8:</b> Concentración plasmática de glucosa, insulina y glucagón y concentración hepática de ARNm del receptor de insulina ( <i>INSR</i> ), de la <i>piruvato carboxilasa (PC)</i> y de la <i>fosfoenolpiruvato carboxikinasa (PCK1)</i> en ovinos consumiendo una pastura templada fresca y suplementados o no con grano de sorgo molido	37
<b>Cuadro 9:</b> Composición química de granos de sorgo: secos (control), remojados por 24 horas (Rem), reconstituidos hasta 300 g/kg de humedad y luego germinados por 5 días (G), germinados por 5 días y ensilados por 21 días (G&E), ensilados por 21 días con el grano entero (E.ge), o ensilados por 21 días con el grano previamente molido (E.gm)	42

	página
<b>Cuadro 10:</b> Sitio de digestión y digestibilidad total de granos de sorgo: secos (control), remojados por 24 horas (Rem), reconstituidos hasta 300 g/kg de humedad y luego germinados por 5 días (G), germinados por 5 días y ensilados por 21 días (G&E), ensilados por 21 días con el grano entero (E.ge), o ensilados por 21 días con el grano previamente molido (E.gm)	42
<b>Cuadro 11:</b> Parámetros de producción de gas <i>in vitro</i> de granos de sorgo: secos (control), remojados por 24 horas (Rem), reconstituidos hasta 300 g/kg de humedad y luego germinados por 5 días (G), germinados por 5 días y ensilados por 21 días (G&E), ensilados por 21 días con el grano entero (E.ge), o ensilados por 21 días con el grano previamente molido (E.gm)	43
<b>Figura 1:</b> Dinámica de la concentración plasmática de glucosa (A), insulina (B), glucagón (C) y relación insulina/glucagón (D) en bovinos consumiendo una pastura templada fresca como único alimento (línea continua) o suplementados con grano de sorgo molido a razón de 15 g/kg de su PV (línea punteada). La hora 0 representa el inicio de la ingesta de alimento y el momento de la suplementación. T, tratamiento; H, hora (medias $\pm$ EEM; n = 6).	37
<b>Figura 2:</b> Dinámica de la concentración plasmática de glucosa (A), insulina (B), glucagón (C) y relación insulina/glucagón (D) en ovinos consumiendo una pastura templada fresca como único alimento (línea continua) o suplementados con grano de sorgo molido a razón de 15 g/kg de su PV (línea punteada). La hora 0 representa el inicio de la ingesta de alimento y el momento de la suplementación. T, tratamiento; H, hora (medias $\pm$ EEM; n = 6).	38

## ABREVIATURAS

A:	producción de gas asintótica (mg/g)
ADIN	nitrógeno insoluble en detergente ácido
AGV:	ácidos grasos volátiles
C:	tiempo en el cual se produce la mitad del gas asintótico (h)
CHRF:	carbohidratos de rápida fermentación
CHNF	carbohidratos no fibrosos
DI:	digestibilidad intestinal
DR:	digestibilidad ruminal
DT:	digestibilidad total
E.ge:	tratamiento ensilado por 21 días con el grano entero
E.gm:	tratamiento ensilado por 21 días con el grano molido
ESPM:	eficiencia de síntesis de proteína microbiana
FAD:	fibra ácido detergente
FND:	fibra neutro detergente
G:	tratamiento germinado por 5 días
G&E:	tratamiento germinado por 5 días y ensilado por 21 días
HPRT:	hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa
INSR:	receptor de insulina
MO:	materia orgánica
MS:	materia seca
N:	nitrógeno
NDIN:	nitrógeno insoluble en detergente neutro
NI:	nitrógeno ingerido
NM:	nitrógeno microbiano
N-NH <sub>3</sub> :	nitrógeno amoniacal
LAD:	Lignina ácido detergente
PB:	proteína bruta
PC:	<i>piruvato carboxilasa</i>
PCK1:	<i>fosfoenolpiruvato carboxikinasa-1</i>
PV:	peso vivo
Rem:	tratamiento remojado por 24 horas
R <sub>max</sub> :	tasa máxima de fermentación <i>in vitro</i> (ml/h)
SPM:	síntesis de proteína microbiana
S0:	tratamiento sin suplementación
S5:	tratamiento suplementado a razón de 5 g/kg del PV
S10:	tratamiento suplementado a razón de 10 g/kg del PV
S15:	tratamiento suplementado a razón de 15 g/kg del PV
TC:	taninos condensados
T <sub>max</sub> :	tiempo al cual ocurre la tasa máxima de fermentación <i>in vitro</i> (h)

## RESUMEN

En el presente trabajo de doctorado se abordó el tema de la utilización del grano de sorgo en bovinos y ovinos. Se realizaron tres experimentos de los cuales surgieron tres artículos científicos publicados en revistas internacionales especializadas en el área. En el *Experimento I* se comparó el efecto de la suplementación con niveles crecientes de grano de sorgo sobre el consumo, la digestibilidad de las diferentes fracciones del alimento y el ambiente ruminal de bovinos y ovinos consumiendo una pastura fresca *a voluntad*. Con similar proporción de grano en la dieta entre especies, el incremento en los niveles de suplementación con grano de sorgo determinó respuestas diferentes en bovinos y ovinos. En los bovinos, el incremento en los niveles de suplementación fue efectivo para incrementar el consumo total de alimento y la utilización digestiva de la dieta. Sin embargo, en los ovinos la suplementación con sorgo determinó una caída en el pH ruminal y una reducción en la digestibilidad de la fibra y en el consumo total de alimento. En el *Experimento II* se evaluó el efecto de la suplementación con grano de sorgo sobre la concentración plasmática de glucosa, insulina y glucagón y la concentración hepática de ARNm del receptor de insulina y de las enzimas *piruvato carboxilasa (PC)* y *fosfoenolpiruvato carboxikinasa (PCK1)* en bovinos y ovinos consumiendo una pastura fresca *a voluntad*. A su vez, se buscaron asociaciones de estas variables con el consumo y la digestión de los nutrientes. En ambas especies, la suplementación con grano de sorgo disminuyó la concentración hepática del ARNm de la enzima *PCK1*, pero no afectó la *PC*. Estos resultados se asociaron a cambios en la concentración plasmática de glucosa y en el perfil endocrino de los bovinos pero no de los ovinos, lo que indicaría que los efectos de la suplementación sobre el consumo y la digestibilidad de los nutrientes condicionan la magnitud de la respuesta. La suplementación con granos a bovinos u ovinos, en balance energético positivo, modificó el metabolismo hepático para priorizar el uso de propionato como precursor neoglucogénico. En el *Experimento III* se evaluó el efecto de la adición de agua *per se*, del proceso de germinado, del proceso de ensilaje o su asociación sobre la composición química, el sitio de digestión y la dinámica de fermentación *in vitro* de granos de sorgo cosechados seco. La adición de agua *per se*, el proceso de germinación o el proceso de ensilaje en granos de sorgo enteros, como factores separados, produjeron cambios en la composición química, pero no mejoraron la digestibilidad del grano de sorgo respecto al grano seco. Sin embargo, la combinación de los procesos de germinación y de ensilaje resultó en cambios en la composición química y en mejoras en la utilización digestiva del grano de sorgo. La molienda del grano antes de su reconstitución y ensilaje fue una alternativa que mejoró el valor nutritivo del grano de sorgo.

## SUMMARY

In the present work the use of sorghum grain in cattle and sheep was addressed. Three experiments were performed and published in international journals. In the *Experiment I* we compared the response to the increase in the level of sorghum grain supplementation of cattle and sheep fed *ad libitum* fresh temperate pasture on feed intake, digestibility and rumen fermentation. Although the sorghum grain proportion in the diet was similar between species in all treatments, the increase in the level of sorghum supplementation led to differential responses in cattle and sheep fed temperate forage. In cattle, the increase was effective in enhancing feed intake and digestive utilization of the diet. However, sorghum grain supplementation fed to sheep resulted in a lower ruminal pH that reduced fiber digestibility and total OM intake. In the *Experiment II* we evaluated the effect of sorghum grain supplementation on plasma glucose, insulin and glucagon concentrations and hepatic mRNA concentrations of insulin receptor, *pyruvate carboxylase (PC)* and *phosphoenolpyruvate carboxykinase (PCKI)*, and their association with nutrient intake, digestion and rumen volatile fatty acids concentrations in cattle and sheep fed a fresh temperate pasture. The inclusion of sorghum grain in the diet decreased *PCKI* mRNA but did not affect *PC* mRNA in both species; these effects were associated to changes in glucose and endocrine profiles in cattle but not in sheep. Results would suggest that sorghum grain supplementation of animals in positive energy balance (cattle and sheep) fed a fresh temperate pasture, would modify hepatic metabolism to prioritize the use of propionate as a gluconeogenic precursor. In the *Experiment III* we evaluated the effect of water addition *per se*, germination process, ensiling process or their association in chemical composition, digestion site and *in vitro* gas production of reconstituted sorghum grain. The soaking, the germination process, or the ensiling of whole sorghum grain as sole factors, produced changes in the chemical composition but did not improve the nutritive value of sorghum grain compared to dry ground grains. However, the combination of germination and ensiling resulted in changes in the chemical composition and improved the digestibility of sorghum grains. The grinding of grain before reconstitution and ensiling is an alternative to increase the sorghum grain digestibility and nutritive value.

## 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la producción de carne y leche en el Uruguay así como sus precios han tenido un fuerte incremento. En la última década, la producción de carne vacuna aumentó un 32% y la faena un 37% (Bervejillo & Tamber, 2013), con precios de exportación que pasaron de 2046 U\$S por tonelada de canal en el año 2002 a 3768 U\$S en 2013, lo que significa un aumento de casi 85% (INAC, 2013). En lo que refiere al rubro ovino, se ha registrado un aumento en el stock y de la faena (Recalde, 2013). En este sentido, la faena industrial de ovinos en el 2013 registró un crecimiento del 44% respecto al 2012 (INAC, 2013). En el rubro lechero, la entrada de leche a plantas industrializadoras aumentó entre el 2002 y el 2013 más de un 85%, pasando de 1060 a 1948 millones de litros. A su vez, los precios que en 2002 promediaron los 11,2 centavos de dólar, presentaron un incremento muy importante situándose en 2013 en el entorno de los 40 centavos de dólar por litro (Vidal & Ilundin, 2002; Vidal, 2013). Según estos analistas las perspectivas para el futuro señalan un escenario favorable para la producción tanto de carne como de leche (Bervejillo & Tamber, 2013; Recalde, 2013; Vidal, 2013).

El crecimiento antes planteado se dió en el marco de grandes cambios a nivel local. En este sentido, el importante aumento en la superficie dedicada a la forestación y a la agricultura sin duda ha tenido incidencia en el dinamismo del sector pecuario. Según DIEA (2014), la superficie agrícola pasó de 842 mil hectáreas sembradas en la zafra 2005-2006 a 1964 mil en la zafra 2012-2013. Este fenómeno provocó un aumento muy importante de la competencia y del precio de la tierra. Es así, que el valor medio de la tierra en Uruguay ha aumentado de manera ininterrumpida a partir de 2003, triplicando en 2013 el valor promedio del período 2000-2010 (3519 vs. 1130 U\$S/ha, respectivamente) (DIEA, 2014). Ésto ha llevado a que, para poder competir, los sistemas de producción pecuarios estén en un permanente proceso de intensificación, lo que ha conducido a la necesidad de aumentar la carga de animales, a la concentración de nutrientes en las dietas, y a la búsqueda de alternativas que permitan aumentar la eficiencia de conversión, mediante mejoras de la calidad de los alimentos y la digestibilidad de la dieta, entre otros factores. En este marco, la suplementación de animales en pastoreo es una herramienta cada vez más utilizada en nuestros sistemas de producción.

El cultivo de sorgo, para su cosecha como grano seco, ha tenido un crecimiento constante en los últimos años, pasando de 15,8 mil hectáreas sembradas y 61,3 mil toneladas de grano producidas en la zafra 2005-2006 a 49 mil hectáreas del cultivo sembradas y 209 mil toneladas de grano producido en la zafra 2012-2013 (DIEA, 2014). Si a estos datos se le suma una estimación del sorgo sembrado fuera de las áreas relevadas y el sembrado para su cosecha temprana, con el fin de realizar ensilaje de grano húmedo, los datos de DIEA aumentan más de tres veces (Methol, 2013). En términos medios, durante el último quinquenio la siembra total estaría en el entorno de 170 mil hectáreas y la producción en unas 583 mil toneladas por año, con valores que van desde un mínimo de 122 mil hectáreas y 373 mil toneladas en la zafra 2005-2006 a un máximo de 250 mil hectáreas y 910 mil toneladas en la zafra 2010-2011 (Methol, 2013). Dado que más del 95% del grano de sorgo producido en Uruguay se consume a nivel interno (Methol, 2013), el crecimiento y la magnitud de su producción ponen en evidencia la importancia que ha adquirido este cultivo en los sistemas de producción pecuarios. En este sentido, su relación de precios con otros granos, su mayor resistencia

a problemas climáticos y al ataque de insectos y hongos, lo hacen una alternativa muy interesante para la suplementación de animales en pastoreo.

Cuando se incluyen granos de cereales como suplemento de pasturas templadas, pueden ocurrir interacciones entre los alimentos. Aunque el consumo total y la digestibilidad de la material seca usualmente se incrementan (Dixon & Stockdale, 1999), la inclusión de granos en la dieta de animales en pastoreo puede reducir el consumo de forraje (Elizalde et al. 1999a), el pH ruminal (Cajarville et al. 2006) y la digestibilidad de la fibra (Hoover, 1986; Van Soest, 1994; Tebot et al. 2012). La magnitud de estos cambios será la que determine el efecto de la inclusión del concentrado en el aprovechamiento digestivo de la dieta total y el efecto que a nivel productivo tenga la suplementación (Dixon & Stockdale, 1999; Stockdale, 2000, Bargo et al. 2003). De acuerdo con los efectos mencionados, la suplementación de animales en pastoreo también podría determinar cambios en el metabolismo de la glucosa y su sistema de regulación. Sin embargo, en la bibliografía consultada no hay estudios que relacionen los efectos sobre el consumo y la digestión de la suplementación con granos, con los efectos provocados por la suplementación sobre el metabolismo de la glucosa de bovinos y ovinos consumiendo pasturas. Ésto abre un campo de trabajo para generar información en este sentido.

Si bien los conceptos antes mencionados, del efecto de la suplementación en consumo y digestibilidad, aplican de manera general a la suplementación de rumiantes en pastoreo, la especie a la que se suplementa puede tener incidencia en la respuesta a la suplementación. En este sentido, algunas observaciones empíricas comunicadas por asesores y productores, marcan que los resultados que se obtienen con la suplementación de ovinos consumiendo pasturas templadas de buena calidad no siempre van en la misma dirección, o son de la misma magnitud, que las obtenidas en bovinos. Varios trabajos realizados a nivel internacional, con animales consumiendo dietas totalmente mezcladas donde el suministro de concentrados se hace mezclado con forrajes conservados, han demostrado diferencias en la utilización digestiva de la dieta entre bovinos y ovinos (Mertens & Ely, 1982; Colucci et al. 1989; Colucci et al. 1990; De Boever et al. 1990; Südekum et al. 1995). Sin embargo, las dietas y modelos de alimentación comúnmente usados en los sistemas semi-intensivos e intensivos de Uruguay se basan en el uso de forraje fresco donde la suplementación con concentrado se realiza una o dos veces al día separado del forraje. Dadas las diferencias en el tipo y manejo de la alimentación entre los trabajos de la bibliografía internacional y lo habitualmente utilizado en Uruguay y la importancia que ha tenido el uso del grano de sorgo en la intensificación de los sistemas de producción, surge la necesidad de generar información que permita evaluar de forma comparativa la respuesta a la suplementación con sorgo en bovinos y ovinos consumiendo pasturas frescas, de forma tal de generar recomendaciones específicas para cada especie.

Debido a la asociación de su matriz proteica a los gránulos de almidón, la proporción y tipo de endospermo predominante en el grano y la presencia de taninos condensados en algunos genotipos, el sorgo tradicionalmente se ha considerado de menor valor nutritivo respecto a otros granos (Hibberd et al. 1982a, Herrera-Saldana et al. 1990, Huntington, 1997, Offner et al. 2003). Estos mismos factores hacen que el sorgo también sea el grano que mayor respuesta muestra a los tratamientos que se aplican en orden de incrementar el valor nutritivo de los granos de cereales (Huntington, 1997, Offner et al. 2003). La tasa y magnitud de digestión del almidón del sorgo

depende básicamente del genotipo en cuestión (Rooney & Pflugfelder, 1986; Hibberd et al. 1982a), del grado de maduración (Curbelo, 2010; Montiel & Elizalde, 2004; Bianco et al. 2000; Huntington, 1997) y de los tratamientos realizados pos-cosecha (Balogun et al. 2006; Balogun et al. 2005; Hill et al. 1991; Russell & Lolley, 1989; Rooney & Pflugfelder, 1986). Trabajos realizados por nuestro equipo de investigación reportaron un aumento importante en la degradabilidad ruminal y en el aprovechamiento digestivo de los granos de sorgo cuando se los cosecha en un estado de maduración temprana y se los ensila como grano húmedo, respecto a los mismos cuando son utilizados en un estado de maduración tardía como grano seco (Curbelo, 2010). Estos resultados coinciden con los publicados por otros autores, quienes reportaron incrementos en la utilización digestiva del grano de sorgo cuando se ensila como grano húmedo (Caorsi & Olivera 2005, Bianco et al. 2000; Huntington, 1997), lo que constituye una ventaja importante al momento de utilizar el grano como alimento en rumiantes. El proceso de ensilaje que se desarrolla durante el almacenamiento anaerobio del grano húmedo tiene efecto en esta respuesta. En este sentido, trabajos desarrollados por nuestro equipo de investigación que estudiaron el efecto del proceso de ensilaje sobre la composición química, la fermentación *in vitro* y el sitio de digestión de granos de sorgos cosechados húmedos, reportaron que el proceso de ensilaje determinó una disminución en la concentración de taninos condensados y de proteína, una mayor fermentación *in vitro* y cambios en el sitio de digestión de los grano húmedos (Curbelo, 2010; Torterolo et al. 2012).

A pesar del incremento que se logra en el valor nutritivo del grano de sorgo por la cosecha temprana y el ensilaje del grano húmedo, una parte muy importante del sorgo que se comercializa en Uruguay es bajo la forma de grano seco. Esto lleva a la necesidad de profundizar en alternativas de tratamientos que aplicadas sobre granos cosechados en un estado de maduración tardía tengan impacto en incrementar el valor nutritivo del grano. En este sentido, la reconstitución del grano seco, que conlleva el remojado del grano para reconstituir su humedad y el almacenamiento anaeróbico, es un tratamiento de bajo costo que puede incrementar el valor nutritivo del sorgo (Simpson et al. 1985, Rooney & Pflugfelder, 1986, Hill et al. 1991). Sin embargo, los procesos que determinan el incremento del valor nutritivo de los granos reconstituidos no están del todo claros. Mientras algunos autores sugieren que el remojado del grano es el factor que determina la respuesta (Simpson et al. 1985), otros no reportan efecto del remojado o el remojado y ensilado del grano sobre su composición química, degradabilidad ruminal o fermentación *in vitro* (Balogun et al. 2005). De acuerdo con algunos autores, un período corto de germinación previo al almacenaje anaeróbico del grano reconstituido acelera la fermentación bacteriana lo cual resulta en mejoras en la digestibilidad del sorgo para rumiantes (Pflugfelder et al. 1986, Balogun et al. 2005). Sin embargo, otros autores reportan un incremento en la degradabilidad y en la digestibilidad total de granos de sorgo reconstituidos y ensilados, sin germinación previa (Hill et al. 1991). Dada la variabilidad en los resultados reportados, surge la necesidad de profundizar en el conocimiento de los efectos que los procesos involucrados en la reconstitución del grano tienen para mejorar el valor nutritivo del sorgo, de modo de optimizar la respuesta a este tratamiento.

En este marco, los trabajos presentados en esta tesis de doctorado tienen como fin aportar información original, de aplicación directa en los sistemas de producción de nuestra región. Considerando las diferencias reportadas en la utilización digestiva entre bovinos y ovinos, y la importancia del grano de sorgo en la intensificación de los

sistemas de producción, en un primer trabajo se comparó el efecto en el consumo, ambiente ruminal y aprovechamiento digestivo de la dieta global del incremento en los niveles de suplementación con grano de sorgo entre bovinos y ovinos consumiendo una pastura fresca *a voluntad*. Este estudio provee información hasta el momento no reportada para el manejo diferencial de los niveles de suplementación con sorgo entre bovinos y ovinos consumiendo una pastura fresca. En un segundo trabajo, se evaluó el efecto de la suplementación con grano de sorgo sobre la concentración plasmática de hormonas y la expresión hepática de genes vinculados al metabolismo de la glucosa de bovinos y ovinos consumiendo una pastura fresca. A su vez, se buscó asociaciones entre estos parámetros y el consumo y la digestión de nutrientes. Este estudio reporta información original de los mecanismos de adaptación en el metabolismo de la glucosa y su relación con el consumo y la digestión de los nutrientes, cuando bovinos y ovinos consumiendo pasturas frescas son suplementados con grano de sorgo. En un tercer trabajo, continuando con la línea de investigación en grano de sorgo que lleva adelante nuestro equipo de investigación, se profundizó en el conocimiento de los procesos involucrados en la reconstitución del grano de sorgo seco y su efecto sobre el aprovechamiento digestivo del grano. De esta forma se busca optimizar la respuesta a este tratamiento en orden de mejorar la calidad del grano para su uso en rumiantes.

## 2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

### 2.1. *Diferencias en la utilización digestiva de la dieta entre bovinos y ovinos*

Varios trabajos se han realizado a nivel internacional para estudiar las diferencias en la utilización digestiva de la dieta entre bovino y ovinos (Cipollini et al. 1951; Mertens & Ely, 1982; Colucci et al. 1989; Colucci et al. 1990; De Boever et al. 1990; Reid et al. 1990; Südekum et al. 1995). Estos estudios reportan diferencias entre las especies cuando los animales son alimentados con forrajes conservados o dietas totalmente mezcladas, donde el suministro del concentrado se realiza en simultáneo con forrajes conservados. De acuerdo a estos reportes, las diferencias entre especies varían con el nivel de consumo (Colucci et al. 1989; Colucci et al. 1990; Südekum et al. 1995), la madurez del forraje (De Boever et al. 1990; Südekum et al. 1995) y con la composición de la dieta (Mertens & Ely, 1982; Colucci et al. 1989; Colucci et al. 1990), aunque los resultados no son consistentes entre los autores.

En una revisión que evalúa los factores que afectan la actividad masticatoria de los rumiantes, De Boever et al. (1990) reportan que por kg de materia seca (MS) los ovinos dan más masticaciones totales, de rumia e ingestivas que los bovinos. Además, el número de masticaciones por minuto es mayor en los ovinos que en los bovinos. Según los autores, estas diferencias se explican mayormente por la diferencia de tamaño entre las especies, ya que los bovinos, al tener un orificio retículo-omasal más grande, necesitan disminuir menos el tamaño de partícula del alimento. Además, los bovinos por tener dientes más grandes son más eficientes en la masticación que los ovinos (De Boever et al. 1990). De acuerdo a estos autores, las diferencias en la actividad masticatoria entre estas dos especies son aún mayores cuando los animales consumen forrajes de mala calidad o el tamaño de fibra es largo (De Boever et al. 1990).

Ya en 1951, Cipollini et al. reportaron que los bovinos tienden a digerir forrajes secos y ensilajes mejor que los ovinos, pero los ovinos tienden a digerir mejor los concentrados. Mertens & Ely (1982), revisando un amplio número de publicaciones que evaluaron la digestibilidad del alimento en bovinos y ovinos consumiendo la misma dieta, indican que el comportamiento de las especies no es igual. Según estos autores, los bovinos digieren alimentos de baja digestibilidad en mayor proporción que los ovinos. Mientras que los ovinos tienen mayor coeficiente de digestibilidad que los bovinos cuando la digestibilidad aparente de la MS de la dieta es mayor a 66% (Mertens & Ely, 1982). Este concepto coincide con los resultados de otros trabajos que demuestran que la digestibilidad de la MS y la fibra neutro detergente (FND) de henos de mala calidad es mayor en bovinos que en ovinos (Playne, 1978; Vona et al. 1984; Reid et al. 1990). Playne (1978) atribuye estas diferencias a una mayor habilidad de los bovinos para reciclar nutrientes limitantes de la dieta (nitrógeno y azufre). A su vez, los bovinos logran consistentemente mayores niveles de consumo, en función de su peso metabólico, que los ovinos cuando se enfrentan a henos de mala calidad (Vona et al. 1984; Reid et al. 1990).

El nivel de consumo y la proporción de concentrado (o almidón) en la dieta afectan de manera diferente la digestibilidad y el tránsito digestivo en ambas especies, sin embargo, los cambios no son consistentes entre autores (Colucci et al. 1989; Colucci et al. 1990; Südekum et al. 1995). Südekum et al. (1995), trabajando con animales alimentados con ensilaje de trigo realizado en diferentes estados fenológicos de la planta

(grano lechoso, pastoso o duro), observaron una mayor digestión de la MO en bovinos que en ovinos cuando fueron alimentados a bajos niveles de consumo, sin embargo las diferencias no se observaron cuando los animales fueron alimentados a altos niveles de consumo. En contraste, Colucci et al. (1999) estudiando el efecto del nivel de consumo (mantenimiento o *a voluntad*) y del nivel de inclusión de concentrado (20, 45 o 70%) en la dieta de bovinos y ovinos consumiendo una dieta totalmente mezclada, reportaron mayor digestibilidad de la MO para ovinos que para bovinos independientemente del nivel de inclusión de concentrado, las diferencias entre especies fueron más evidentes a altos niveles de ingestión. El incremento en el nivel de consumo disminuye la digestibilidad de la MO en ambas especies, sin embargo la magnitud de la caída es mayor para los bovinos que para los ovinos (Colucci et al. 1989; Südekum et al. 1995). De acuerdo con Colucci et al. (1989), el incremento en el nivel de consumo deprime la digestibilidad de la fibra y del almidón en bovinos, mientras que en ovinos disminuye la digestibilidad de la fibra (en menor proporción que en bovinos), sin afectar la digestibilidad del almidón. Mientras tanto, Südekum et al. (1995) reportan una caída similar en la digestibilidad de las diferentes fracciones del alimento con el incremento del nivel de consumo en ambas especies. De acuerdo con Colucci et al. (1989), a altos niveles de consumo, el incremento en la proporción de grano en la dieta lleva a un incremento en la digestibilidad de la MO mayor en los ovinos que en los bovinos. Esto se debe a una mayor digestibilidad de la FND y del almidón por parte de los ovinos. Esta mayor digestibilidad del almidón en ovinos respecto a los bovinos puede estar relacionado al hecho que la tasa de pasaje fue menor en los ovinos que en los bovinos (Colucci et al. 1990). Según Colucci et al. (1989), las diferencias en capacidad de digestión entre especies es más evidente en dietas de mayor digestibilidad, donde los ovinos presentan mayores valores que los bovinos, resultado que coincide con lo reportado por Mertens & Ely, (1982).

Como queda claramente explicitado, los estudios que reportan diferencias en la utilización digestiva de la dieta entre bovinos y ovinos han sido conducidos con animales alimentados en base a forrajes conservados (henos o ensilajes) y ofreciendo el concentrado en una dieta totalmente mezclada. Sin embargo, no hay información disponible acerca de las diferencias entre especies cuando los animales tienen acceso sin restricción a una pastura fresca y el concentrado se ofrece como un suplemento separado del forraje. En este tipo de sistemas de alimentación, los animales usualmente tienen menor consumo de MS y de energía y patrones de pH ruminal mas variables a lo largo del día que los animales consumiendo dietas totalmente mezcladas (Kolver & Muller, 1998; Bargo et al. 2002a, 2002b). Además, el incremento en los niveles de carbohidratos no fibrosos (CHNF) lleva a diferentes respuestas en dietas a base de pasturas que en dietas totalmente mezcladas. A modo de ejemplo, la eficiencia en la síntesis de proteína microbiana no se incrementa por la suplementación de CHNF en la dieta de bovinos (García et al. 2000; Sairanen et al. 2005) y ovinos (Amaral, et al. 2011; Tebot et al. 2012) consumiendo pasturas templadas. Estos resultados probablemente están asociados no sólo a la calidad de la pastura, sino también al manejo de la alimentación. Como se plantea más adelante en esta revisión, cuando se incluyen granos de cereales como suplemento a pasturas templadas de buena calidad se pueden dar interacciones entre los alimentos. De manera general, el consumo total y la digestibilidad de la MO de la dieta aumentan por la suplementación (Dixon & Stockdale, 1999; Bargo et al. 2003), mientras que la inclusión de granos en la dieta puede disminuir el consumo de forraje (Elizalde et al. 1999a, Bargo et al. 2003; Sairanen et al. 2005), el pH ruminal (Elizalde et al. 1999a; Cajarville et al. 2006) y la

digestibilidad de la fibra (Hoover, 1986; Van Soest, 1994; Tebot et al. 2012). Sin embargo, ¿estos cambios son de igual magnitud en bovinos y ovinos? Según los trabajos revisados en la bibliografía internacional no hay suficiente información para responder esta pregunta.

## ***2.2. Suplementación con granos a rumiantes consumiendo pasturas templadas de buena calidad***

Las pasturas templadas de buena calidad, como son las praderas mezcla de gramíneas y leguminosas y los verdeos, son ampliamente utilizadas en los sistemas intensivos y semi-intensivos de producción de bovinos y ovinos en Uruguay. Este tipo de pasturas son una excelente fuente de nutrientes a bajo costo utilizada para la alimentación de rumiantes. Según Bargo et al. (2003), contienen entre un 18 y 24% de materia seca (MS), 18 a 25% de proteína bruta (PB), 40 a 45% de fibra neutro detergente (FND) y de 1,53 a 1,67 Mcal/kgMS de energía neta de lactación. La MO y las fracciones nitrogenadas de este tipo de pasturas son muy degradables en rumen (Hoffman et al. 1993; Elizalde et al. 1999b; Bargo et al. 2003; Repetto et al. 2005). Sin embargo, la concentración energética de este tipo de alimentos, en adición a sus altos contenidos de humedad y fibra puede resultar en bajos consumos de MS y energía (NRC, 1996; NRC, 2001). Ésto, junto a las fluctuaciones en la disponibilidad de forraje que se dan en las diferentes épocas del año, ha llevado al desarrollo de sistemas de alimentación que combinan pasturas y cantidades variables de suplemento en la dieta.

Cuando granos de cereales son incluidos como suplemento a pasturas templadas de buena calidad, interacciones entre los alimentos pueden ocurrir. Estas interacciones pueden repercutir en cambios en el consumo y en el ambiente ruminal lo que podría llevar a variaciones en la cantidad de proteína microbiana que llega a duodeno. La digestibilidad total de la dieta puede variar, lo mismo que la digestibilidad de las distintas fracciones del alimento. La magnitud de estos cambios será pues la que determine el efecto de la inclusión del concentrado en el aprovechamiento digestivo total de la dieta y el efecto a nivel productivo que tenga la suplementación (Dixon & Stockdale, 1999; Stockdale, 2000; Bargo et al. 2003).

### ***2.2.1 Efecto de la suplementación sobre el consumo***

Varios trabajos realizados en rumiantes consumiendo pasturas templadas de buena calidad, muestran un incremento en el consumo de MS total cuando se incluyen concentrados energéticos en la dieta (Vazquez & Smith, 2000; Bargo et al. 2002c; Bargo et al. 2003), este incremento es mayor cuanto mayor es el nivel de suplementación (Elizalde et al. 1999a; Reis & Combs, 2000; Sairanen et al. 2005). Según Dixon & Stockdale, (1999), cuando se suplementa forrajes con granos pueden ocurrir efectos asociativos entre los alimentos que lleven a cambios en el consumo y en la digestibilidad de la dieta. La suplementación de pasturas templadas con concentrados en base a granos normalmente repercute en una disminución del consumo de forraje (Berzaghi et al. 1996; Elizalde et al. 1999a; Vazquez & Smith, 2000; Reis & Combs, 2000; Bargo et al. 2002c; Bargo et al. 2003; Sairanen et al. 2005; Amaral, et al. 2011). Este efecto se conoce como sustitución. Conceptualmente la tasa de sustitución refleja los kg de forraje que, respecto a animales sin suplementar, el animal deja de consumir por cada kg de concentrado incluido en la dieta. Cuando la tasa de sustitución es menor que 1, el consumo total del grupo suplementado es mayor al del grupo sin suplementar.

Cuando es igual a 1, no hay diferencias entre el consumo del grupo sin suplementar y del suplementado. Tasas de sustitución mayores 1, denotan que la suplementación repercute en caídas de consumo total respecto al grupo sin suplementar. Según Dixon & Stockdale (1999) esto ocurre cuando se dan efectos asociativos negativos entre alimentos que limitan el crecimiento microbiano y la digestión de la fibra. Tasas de sustitución negativas resultan de efectos asociativos positivos entre el forraje y el suplemento suministrado, de forma tal que el consumo de forraje resulta mayor en el grupo suplementado (Dixon & Stockdale, 1999). La tasa de sustitución explica en gran parte la respuesta a la suplementación por parte de los animales. Normalmente hay un efecto inverso entre tasa de sustitución y respuesta a la suplementación, altas tasas de sustitución resultan en pequeños incrementos en el consumo total con lo cual la respuesta a la suplementación es baja (Stockdale, 2000; Bargo et al. 2003, Forbes, 2007).

Varios factores afectan la tasa de sustitución en rumiantes, entre ellos se encuentran factores asociados a la pastura, al suplemento y al animal. Dentro de los factores asociados a la pastura, la calidad de la misma, la disponibilidad por unidad de superficie, la altura y la densidad de forraje han demostrado tener efecto en la tasa de sustitución. A su vez, la cantidad y tipo de suplemento, así como el merito genético y el nivel de producción de los animales, también determinan la tasa de sustitución. (Dixon & Stockdale, 1999; Bargo et al. 2003). Cuando se suplementa con granos a rumiantes, la disminución en el consumo de forraje es mayor cuanto mayor es la calidad del forraje ofrecido al animal (Dixon & Stockdale, 1999; Stockdale, 2000; Forbes, 2007). De igual forma, la suplementación de rumiantes consumiendo pasturas a baja oferta por animal, repercute en menores tasas de sustitución que cuando se suplementa a animales consumiendo pasturas a altas oferta (Dixon & Stockdale, 1999; Stockdale, 2000; Bargo et al. 2002c; Bargo et al. 2003). De manera general, la suplementación con forrajes, provoca caídas en el consumo de pasto mayores que la suplementación con concentrados (Stockdale, 2000, Bargo et al. 2003). Sin embargo, en algunas ocasiones la suplementación con concentrados puede provocar mayores tasas de sustitución respecto a la suplementación con forrajes, esto puede ser debido al desarrollo de disturbios ruminales, como la acidosis sub-clínica, que afecten la degradación de la fibra (Stockdale, 2000). Según Bargo et al. (2003), no hay información suficiente que permita concluir si la suplementación con concentrados de tipo fibroso o almidonoso tiene efectos diferentes en la tasa de sustitución. La cantidad de concentrado incluido en dietas de animales consumiendo pastura templada de buena calidad, influye sobre la tasa de sustitución. Según Stockdale (2000a), la tasa de sustitución aumenta 0,03 kg MS por cada kg de suplemento adicional consumido. En este sentido, varios son los trabajos que reportan una caída en el consumo de forraje y un aumento en el consumo total en la medida que se incrementan los niveles de suplementación con concentrados en base granos (Elizalde et al. 1999a; Stockdale, 2000; Reis & Combs, 2000; Sairanen et al. 2005; McEvoy et al. 2008).

### **2.2.2. Efecto de la suplementación sobre la digestibilidad de la Materia Orgánica y de la Fibra de la dieta**

Debido a que usualmente los granos presentan mayor digestibilidad de la MO que el forraje, es esperable un aumento en la digestibilidad de la dieta por la inclusión de concentrados en animales consumiendo pasturas como único alimento (Dixon & Stockdale, 1999; Bargo et al. 2003). Sin embargo, trabajos realizados sobre animales consumiendo pasturas templadas de buena calidad reportan diferentes efectos de la inclusión de concentrados sobre la digestibilidad de la MO. Mientras que algunos autores reportan un aumento en esta variable (Elizalde et al. 1999a; Reis & Combs, 2000; Amaral, et al. 2011; Tebot et al. 2012), otros no encontraron cambios en la digestibilidad por la inclusión de concentrados en la dieta (van Vuuren et al. 1993; García et al. 2000; Sairanen et al. 2005). La variabilidad de estos resultados puede estar asociada a la ocurrencia de interacciones entre los alimentos que llevan a una disminución de la digestión de la fibra en rumen, lo cual determina que los cambios en la digestibilidad de la MO puedan ser menores a los esperados (Dixson & Stockdale, 1999).

Hoover (1986), plantea que la inclusión de 10 a 15% de carbohidratos de rápida fermentación (CHRF) en la dieta, pueden afectar la digestión de la fibra, aunque depresiones más severas se encuentran cuando los niveles de CHRF o de grano sobrepasan el 30% de la MS total. Según el autor, la depresión de la digestión de la fibra a nivel ruminal al incluir CHRF en la dieta, podría ser explicada por 3 factores: una disminución del pH ruminal, una preferencia de los microorganismos ruminales a la digestión de los CHRF respecto a la fibra, o por una proliferación diferencial de microorganismos en el rumen (Hoover, 1986). Según este autor, caídas del pH ruminal por debajo de 6,0 afectan seriamente la digestión de la fibra. Sin embargo, una disminución en la degradabilidad de esta fracción puede darse sin cambios de pH ruminal, lo cual estaría asociado a una disminución de la adherencia bacteriana a la fibra al incluir CHRF en la dieta (Hoover, 1986).

De los trabajos revisados que estudiaron el efecto de la suplementación con concentrados energéticos en animales consumiendo pasturas templadas de buena calidad sobre la digestión de la fibra, 5 reportan una disminución de la digestibilidad total de la fibra (van Vuuren et al. 1993; Berzaghi et al. 1996; Bargo et al. 2002c; Sairanen et al, 2005; Tebot et al. 2012) y 5 no encontraron efecto de la inclusión de concentrados en la dieta sobre la digestibilidad de esta fracción (Jones-Endsley et al. 1997; Elizalde et al, 1999b; García et al. 2000; Reis & Combs, 2000; Amaral, et al. 2011). De los ensayos que reportan cambios en la digestión de la fibra, 2 de ellos no encontraron efecto de los tratamientos sobre el pH ruminal (van Vuuren et al. 1993; Berzaghi et al. 1996). Estos autores explican sus resultados por el efecto que podría tener el aumento de CHRF sobre la actividad celulolítica en rumen. Sairanen et al. (2005), reportan una disminución lineal del pH ruminal de 6,41 a 6,17, una disminución de 4,3% en la degradabilidad ruminal de la FND, y de 5,3 en la digestibilidad total de la FND, al incrementar los niveles de suplementación con un concentrado en base a granos hasta 6 kg por animal, lo que representó un 25% de la dieta total. Según estos autores, a pesar que el pH medio para el grupo de máxima suplementación fue de 6,17, los animales presentaron durante 7 horas valores de pH entre 6,2 y 5,8, lo que junto al efecto que el almidón podría tener sobre la adhesión bacteriana, explicarían sus resultados. Tebot et al. (2012), estudiando en ovinos, el efecto de la suplementación con

grano de cebada o con una mezcla de cebada y melaza sobre la digestibilidad de una avena en 2 estados fenológicos, reporta una disminución de la digestibilidad de la FND cuando se suplementó la pastura en estado vegetativo temprano, sin encontrar diferencias entre los grupos suplementados. Dado que el pH medio registrado respecto al grupo control fue menor para el grupo suplementado con cebada (6,15 vs 6,33) y mayor para el grupo suplementado con la mezcla grano melaza (6,51 vs 6,33), estos resultados no podrían ser atribuidos exclusivamente a las variaciones observadas en el pH ruminal. De los trabajos que no reportan cambios en la digestibilidad de la fibra, la mayor parte no encontraron cambios en el pH ruminal (Jones-Endsley et al. 1997; García et al. 2000; Reis & Combs, 2000; Amaral, et al. 2011). Sin embargo, Elizalde et al. (1999b) estudiando el efecto de la inclusión de niveles crecientes de grano de maíz en novillos consumiendo alfalfa en estado vegetativo, reportan una disminución lineal en el pH ruminal, pasando de 6,29 en el grupo consumiendo pastura *a voluntad*, a 6,09 en el grupo de máxima suplementación. Sin embargo, estas variaciones en el pH ruminal no afectaron la digestibilidad total ni la degradabilidad ruminal de la fibra, la cual fue en promedio 62,9% y 54,8%, respectivamente. Estos autores atribuyen sus resultados al relativo menor efecto que tiene la disminución del pH ruminal en la digestión de la fibra de pasturas de buena calidad.

### **2.2.3. Efecto de la suplementación sobre el ambiente ruminal**

El ambiente ruminal de animales consumiendo pasturas templadas de buena calidad se caracteriza por tener valores medios de pH entre 6,0 y 6,8, niveles de nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) variables, que promedian los 20 mg/dL y que pueden llegar a niveles que sobrepasan los 30 mg/dL. Los AGV alcanzan concentraciones entre 100 y 120 mmol/L, con relaciones acetato/propionato de 3,5-4,0/1 (Bargo et al. 2003). El efecto de la inclusión de concentrados energéticos en base a granos de cereales sobre el ambiente ruminal de animales consumiendo pasturas de alta calidad fue estudiado por varios autores (van Vuuren et al. 1993; Berzaghi et al. 1996; Elizalde et al. 1999a; Reis & Combs, 2000; García et al. 2000; Bargo et al. 2002c; Sairanen et al. 2005; Cajarville et al. 2006; Amaral, et al. 2011; Tebot et al. 2012).

El efecto que la inclusión de concentrados tiene sobre el pH ruminal de animales consumiendo pasturas templadas de alta calidad no es consistente. Mientras que algunos trabajos reportan una disminución en el pH (Elizalde et al. 1999a; Bargo et al. 2002c; Sairanen et al. 2005; Cajarville et al. 2006; Tebot et al. 2012), otros no encuentran cambios por la inclusión de concentrados sobre este tipo de pasturas (van Vuuren et al. 1993; Berzaghi et al. 1996; Reis & Combs, 2000; García et al. 2000, Amaral, et al. 2011). Según Bargo et al. (2003), la falta de consistencia del efecto de la cantidad de concentrado en la dieta sobre el pH ruminal en animales consumiendo pasturas templadas de buena calidad, sugiere que no hay una relación directa entre la cantidad de concentrado y esta variable. En este sentido, Kolver & de Veth (2002) plantean que, debido a la naturaleza multifactorial de la regulación del pH, una sola variable relacionada a la dieta no puede ser capaz de explicar las variaciones en el pH ruminal en animales consumiendo dietas en bases a forrajes frescos de buena calidad. Probablemente otros factores como el nivel de consumo, el nivel de fibra efectiva en la dieta, el manejo y la adaptación de los animales a la dieta, estén actuando y puedan ayudar a explicar la variación en estos resultados

El efecto de la suplementación sobre la concentración de N-NH<sub>3</sub> en rumen es más consistente. Varios trabajos reportan una disminución en los valores medios de N-NH<sub>3</sub> en rumen cuando se suplementa con concentrados energéticos a animales consumiendo pastura de buena calidad; esta disminución es mayor cuanto mayor es la inclusión del concentrado en la dieta (van Vuuren et al. 1993; Berzaghi et al. 1996; Elizalde et al. 1999b; Reis & Combs, 2000; García et al. 2000, Bargo et al. 2002c; Sairanen et al. 2005; Amaral, et al. 2011). Según estos autores, la caída en los niveles de N-NH<sub>3</sub> en rumen es explicada por una mayor captación para la síntesis microbiana en rumen (Bargo et al. 2002c; Sairanen et al. 2005), por una reducción en el consumo de nitrógeno proveniente del forraje y del nitrógeno total en la dieta (Elizalde et al. 1999b; García et al. 2000; Amaral, et al. 2011), o por la combinación de ambos efectos (Berzaghi et al. 1996; Reis & Combs, 2000).

En varios trabajos reportados, la suplementación de pasturas templadas con concentrados en base a granos no varió los niveles de AGV totales respecto al grupo sin suplementar (Berzaghi et al. 1996; García et al. 2000; Reis & Combs, 2000; Sairanen et al. 2005). Ésto podría ser debido a la alta degradabilidad de la MO de este tipo de pasturas (Kolver & de Veth, 2002), que determina elevados niveles de AGV en rumen de los animales que las consumen como único alimento. Si bien la inclusión de concentrados en la dieta no afecta mayormente la producción de AGV totales en rumen, ésta sí repercute en modificaciones en el perfil de AGV en el fluido ruminal. La relación acetato/propionato disminuye, debido a una disminución en los niveles de acetato (Sairanen et al. 2005), a aumentos en los niveles de propionato (Berzaghi et al. 1996; Reis & Combs, 2000, Bargo et al. 2002c) o por la combinación de ambos efectos (Elizalde et al. 1999b; García et al. 2000). Estas modificaciones son mayores cuanto mayor es el nivel de inclusión del concentrado en la dieta (Elizalde et al. 1999b; Reis & Combs, 2000; Sairanen et al. 2005). Las causas de esta alteración en el perfil de AGV estarían determinadas por la variación en la proporción de carbohidratos estructurales y no estructurales (almidón) que se da en la dieta al incluir los concentrados.

#### ***2.2.4. Efecto de la suplementación sobre la síntesis de proteína microbiana y su eficiencia en rumen***

La proteína microbiana sinterizada en rumen es la principal fuente de aminoácidos que llega al duodeno de los rumiantes, representando del 50 al 80% de la proteína total absorbida (Nocek & Russell, 1988; Bach et al. 2005). La disponibilidad de nutrientes y la eficiencia que tengan los microorganismos ruminales para su uso son los factores más importantes que determinan la producción de proteína microbiana (Clark et al. 1992; Bach et al. 2005). Según Clark et al. (1992), cuando el nitrógeno (N) en rumen no es limitante (niveles de N-NH<sub>3</sub> ruminal mayores a 5 mg/dL), la síntesis de proteína microbiana (SPM) está fuertemente relacionada al consumo de MO y a la proporción de ésta que es fermentada en rumen. Hoover & Stokes (1991), plantean que la energía disponible para el crecimiento bacteriano dependerá de la tasa de digestión en rumen de las distintas fuentes de carbohidratos. Es así, que un aumento en los niveles de carbohidratos no estructurales en la dieta, aumentaría la energía disponible para los microorganismos ruminales y de esa forma la producción de proteína microbiana en rumen (Hoover & Stokes, 1991; Clark et al. 1992; Bach et al. 2005). Así mismo, además del nivel de N en rumen, la presencia de formas orgánicas de N en el fluido ruminal como aminoácidos, aminoácidos ramificados y péptidos afectarían de forma positiva la producción de proteína microbiana (Hoover & Stokes, 1991; Clark et al.

1992; Bach et al. 2005). Bach et al. (2005) plantean que una buena nutrición ruminal permite lograr una alta eficiencia de síntesis de proteína microbiana (ESPM), maximizar el crecimiento microbiano, aumentar el flujo de aminoácidos al duodeno y disminuir las pérdidas de N al medio ambiente. La ESPM expresada como gramos de nitrógeno microbiano por kg de MO verdaderamente digerida en rumen (gNM/kgMOVDR), es un buen indicador de la eficiencia de uso de la energía en rumen para la SPM (Bach et al. 2005). Al ser normalmente la energía la principal limitante para la producción microbiana, optimizar la ESPM en función de la energía disponible en rumen permitiría maximizar el crecimiento microbiano (Hoover & Stokes, 1991; Bach et al. 2005).

En varios trabajos revisados, la suplementación con concentrados energéticos o el incremento en los niveles de suplementación en dietas de animales consumiendo pasturas templadas de buena calidad no provocó cambios en el flujo de nitrógeno microbiano (NM) a duodeno (van Vuuren et al. 1993; Berzaghi et al. 1996; Jones-Endsley et al. 1997; Elizalde et al. 1999b; García et al. 2000; Amaral, et al. 2011). Sairanen et al. (2005) plantean que el flujo de NM a duodeno en animales consumiendo pastura de buena calidad sólo se puede incrementar si se logra un aumento en el consumo de MO fermentable en rumen. Van Vuuren et al. (1993) reportan un aumento en la ESPM expresada en función de la MO aparentemente digerida en rumen, cuando se suplementó con un concentrado rico en almidón a animales consumiendo una pastura templada de buena calidad. Sin embargo, la mayoría de los trabajos revisados no encontraron incrementos en la ESPM, expresada en función de la energía disponible en rumen, por la adición de concentrados en dietas de animales consumiendo pasturas de buena calidad (Berzaghi et al. 1996; Elizalde et al. 1999b; García et al. 2000; Sairanen et al. 2005; Amaral, et al. 2011; Tebot et al. 2012). Ésto podría ser explicado por las altas ESPM que se lograron en los grupos consumiendo pastura como único alimento, las cuales en promedio fueron de 28,3 gNM/kgMOVDR (rango 20- 34,6), valores que son muy próximos a los reportados por Bach et al. (2005) como óptimo para el crecimiento microbiano en rumen. Hoover & Stoke (1991), plantean que los monómeros de carbohidratos resultantes de la digestión en rumen aportan cantidades similares de ATP a los microorganismos, con lo cual la tasa de digestión de los carbohidratos es la que determina la energía disponible para el crecimiento bacteriano. Es así, que la alta tasa de digestión de la fibra y de la MO que tienen las pasturas templadas, podrían ser una fuente de energía fácilmente disponible para los microorganismos ruminales, debido a esto la suplementación con granos sobre este tipo de pasturas no repercutiría en un aumento de la ESPM (García et al. 2000; Sairanen et al. 2005).

#### ***2.2.5. Efecto de la suplementación sobre parámetros metabólicos y la expresión hepática de genes vinculados al metabolismo de la glucosa***

Debido a las características digestivas de los rumiantes, sus niveles de glucosa en sangre dependen fundamentalmente de la neoglucogénesis hepática. El propionato producido a nivel ruminal es cuantitativamente el principal precursor neoglucogénico (Drakley et al. 2001, Huntington et al. 2006), siendo precursor de entre el 55 y 70% de la glucosa formada en hígado (Reynolds et al. 1988; Reynolds et al. 2003; Huntington et al. 2006). Los aminoácidos como alanina, glutamina, cisteína, glicina, serina y treonina, son otros importantes precursores para la neoglucogénesis hepática, aportando entre un 15 y un 20% de la glucosa formada en hígado (Reynolds et al. 1988; Reynolds et al. 2003; Huntington et al. 2006). El glicerol, aunque cuantitativamente de menor

importancia en la síntesis de glucosa, puede ser un precursor de importancia en situaciones donde se dé alta movilización grasa (Drakley et al. 2001, Huntington et al. 2006). La digestión y absorción intestinal del almidón de la dieta también puede constituir un aporte importante a la glucosa sanguínea (Huntington et al. 2006). Sin embargo, en rumiantes consumiendo dietas a base de forrajes la glucosa de origen dietario normalmente hace una contribución muy menor para cubrir los requerimientos de los animales (Reynolds et al. 1994).

La glucosa plasmática es regulada por cambios en las concentraciones de insulina y glucagón en sangre. La insulina disminuye la neoglucogénesis hepática por disminuir la síntesis de glucosa desde sustratos que entran vía piruvato, sin embargo no altera la conversión de propionato a glucosa (Drakley et al. 2001, Huntington et al. 2006). Mientras tanto, el glucagón estimula directamente la conversión de propionato en glucosa y el uso de aminoácidos para la neoglucogénesis (Drakley et al. 2001). Es así que la variación en la relación insulina/glucagón juega un papel muy importante en la regulación de la neoglucogénesis (She et al. 1999; Drakley et al. 2001). La *piruvato carboxilasa (PC)* y *fosfoenolpiruvato carboxikinasa (PCK1)* son dos enzimas llaves en la neoglucogénesis. La *PC* prioriza el uso de alanina, glicerol y lactato como elementos neoglucogénicos, mientras que la *PCK1* prioriza la neoglucogénesis a partir de propionato y aminoácidos neoglucogénicos (Drackley et al. 2001). La expresión del ARNm de estas dos enzimas es regulada por el aporte de precursores neoglucogénicos al hígado así como por la insulina y el glucagón (She et al. 1999; Bobe et al. 2009)

De acuerdo a la bibliografía consultada, aun no se ha profundizado suficientemente en cómo la inclusión de concentrados en dietas de animales consumiendo pasturas templadas de buena calidad afecta las concentraciones de glucosa, insulina y glucagón en sangre y la expresión hepática de genes vinculados al metabolismo de la glucosa en estos animales. Trabajos realizados fundamentalmente sobre vacas lecheras en transición y alimentadas con dietas totalmente mezcladas, han demostrado que cambios en el estatus nutricional del animal, en el consumo de energía, o en el perfil de nutrientes que aporta la dieta pueden determinar cambios en el nivel o tipo de precursores neoglucogénicos y en el sistema homeostático de la glucosa (Harmon, 1992; Velez & Donkin, 2005; Karcher et al. 2007; Lemosquet et al. 2009). Tanto en vacas lecheras, como en ganado de carne el consumo de energía está directamente relacionado con la tasa de neoglucogénesis hepática y con la cantidad de propionato que se convierte en glucosa (Huntington et al. 2006). Dado que la inclusión de concentrados en dietas de animales consumiendo pasturas templadas de buena calidad resulta en un aumento en los niveles de propionato en rumen y de la llegada de MO y almidón a intestino (Berzaghi et al. 1996; Elizalde et al. 1999a; García et al. 2000) serían esperable cambios en los mecanismos que actúan en la homeostasis de la glucosa por la inclusión de concentrados en dietas de animales consumiendo pasturas de buena calidad. En este sentido, trabajos realizados a nivel nacional, evaluando el efecto de períodos cortos de suplementación sobre el desempeño reproductivo de vacas u ovejas manejadas en campo natural, demuestran un incremento en las concentraciones plasmáticas de glucosa e insulina como consecuencia de la suplementación (Viñoles et al. 2005; Astessiano et al. 2013). Sin embargo, en la bibliografía consultada no hay estudios que relacionen los efectos de la suplementación con granos sobre el consumo y la digestión, con los efectos provocados por la suplementación sobre el metabolismo de la glucosa de bovinos y ovinos consumiendo pasturas.

## **2.3. El grano de sorgo como suplemento para rumiantes**

### **2.3.1. Generalidad de los granos de cereales**

El principal componente de los concentrados que se utilizan para la suplementación de rumiantes son los granos de cereales y sus subproductos. Los granos de cereales son esencialmente concentrados energéticos cuyo componente fundamental de la materia seca es el almidón (Herrera-Saldana et al. 1990). El almidón es un homopolisacarido complejo formado por dos tipos de polímeros de glucosa, la amilosa y la amilopectina (Huntington, 1997). La amilosa es un polímero lineal cuyas moléculas se unen a través de enlaces  $\alpha$ 1-4, mientras que la amilopectina es un polímero ramificado, cuyas ramificaciones se unen a una cadena central mediante enlaces  $\alpha$ 1-6 (Huntington, 1997). Si bien la proporción de amilosa y amilopectina puede variar entre los diferentes tipos y variedades de granos, generalmente la amilosa se encuentra en menor proporción (20-30% del almidón) que la amilopectina (70-80% del almidón), e incluso puede no estar presente en las variedades de granos llamados cerosos o waxy (Rooney & Ppfulgfelder, 1986; Huntington, 1997). De manera general, la digestibilidad del almidón es inversamente proporcional al contenido de amilosa (Rooney & Ppfulgfelder, 1986; Montiel & Elizade, 2004). Esto es debido a que las moléculas de amilosa se orientan dentro de los cristales de amilopectina, causando un aumento en las uniones de hidrógeno intermoleculares lo que limita tanto la hinchazón como la hidrólisis enzimática del almidón (Rooney & Ppfulgfelder, 1986).

Anatómicamente los granos de cereales constan de tres partes bien diferenciadas, ellas son: el pericarpio (8% del peso seco del grano), embrión (7-12% del peso seco del grano) y endospermo (80-85% de la MS) (Huntington, 1997; Evers et al. 1999). El pericarpio actúa como barrera de protección contra agentes externos, es la parte más externa del grano y el primer obstáculo para la digestión (Huntington, 1997). El endospermo es el componente cuantitativamente más importante del grano y es la estructura donde se ubica el almidón embebido en una matriz proteica (Rooney & Pfulgfelder, 1986; Huntington, 1997). Dentro del endospermo, el almidón se dispone en forma de gránulos. De acuerdo a la estructura y disposición de estos gránulos de almidón, el endospermo se divide en dos tipos: córneo y harinoso (Huntington, 1997). El endospermo córneo se ubica en la periferia del grano, donde el almidón se constituye en gránulos pequeños, rodeados de una matriz proteica continua formada principalmente por proteínas de difícil digestión (prolaminas y gluteinas) (Rooney & Pflugfelder, 1986; Huntington, 1997). El endospermo harinoso se encuentra en la parte central del grano donde el almidón se dispone en gránulos grandes rodeados de una matriz proteica discontinua formada principalmente por albuminas y globulinas de fácil digestión (Rooney & Pflugfelder, 1986; Huntington, 1997). Las características de la matriz proteica que rodea a los gránulos de almidón en cada tipo de endospermo determina el grado de digestión del almidón (Herrera-Saldana et al. 1990; McAllister et al. 1993). Es así, que el almidón contenido en el endospermo harinoso es más susceptible a la digestión y a la acción de diferentes procesamientos que el contenido en el endospermo córneo (Huntington, 1997). La proporción de cada tipo de endospermo es diferente en cada especie de grano, predominando el endospermo córneo en maíz y sorgo y el harinoso en trigo y cebada (Herrera-Saldana, 1990; Offner et al. 2003). A su vez la relación del endospermo córneo con respecto al harinoso, se puede ver incrementada con la maduración del grano y la fertilización nitrogenada (Owens & Zinn, 2005).

La degradabilidad del almidón de los granos de cereales oscila entre 50 y 95 %, siendo los más bajos para granos como el maíz y el sorgo y los más altos para trigo y cebada (Offner et al. 2003; Huntington, 1997). Esta degradación ruminal condiciona el grado de utilización digestiva de los mismos por el rumiante (Owens et al. 1997; Huntington, 1997). Los tratamientos que aumentan la degradación ruminal, inciden en forma directa sobre la disponibilidad de energía para el animal, al tiempo que favorecen el crecimiento de la población microbiana en el rumen (Poore et al. 1993). La tasa y magnitud de la digestión ruminal del almidón de los cereales depende, en lo que al grano se refiere, básicamente del genotipo en cuestión (Martin et al. 1999; Philippeau et al. 1999) y de los tratamientos realizados (Balogun et al. 2006; Fellner et al. 2001; Swingle et al. 1999; Huck et al. 1999; Hill et al. 1991). Otros factores que interactúan son, composición de la dieta, nivel de consumo y adaptación al alimento (Huntington, 1997).

### **2.3.2. Particularidades del grano de sorgo**

El grano de sorgo tradicionalmente ha sido considerado de menor valor que otros granos para la alimentación de rumiantes (Hibberd et al. 1982a, Herrera-Saldana et al. 1990, Huntington, 1997, Offner et al. 2003). Sin embargo, el sorgo puede crecer bajo condiciones ambientales más estresantes (menos agua, altas temperaturas o suelos menos fértiles) que otros granos (Stock, 1999). De manera general, las diferentes variedades de grano de sorgo presentan una gran dispersión en su composición química y en la disponibilidad de su almidón, lo que determina una gran variabilidad de su valor nutritivo (Hibberd et al. 1982a). De acuerdo con algunos autores, la digestibilidad del grano es resultado de la proporción y tipo de las proteínas del endospermo, de la asociación de su matriz proteica a los gránulos de almidón, de la proporción de endospermo córneo y del nivel de taninos que presente la variedad del grano (Hibberd et al. 1982a, Herrera-Saldana et al. 1990, Huntington, 1997, Offner et al. 2003).

En el caso particular del sorgo, además de los endospermos córneo y harinoso, este grano posee un endospermo periférico muy desarrollado. El endospermo periférico, situado por debajo del pericarpio, se caracteriza por ser extremadamente duro, denso y resistente a la entrada de agua. Posee gránulos muy pequeños de almidón y una matriz proteica continua formada por prolaminas (kafirinas) que lo hace muy resistente a la degradación enzimática (Rooney & Pflugfelder, 1986; Duodu et al. 2003; Montiel & Elizalde, 2004). La presencia de taninos, que puede variar de 0,2 a 6,9% de acuerdo al híbrido (Evers et al. 1999), también condiciona el aprovechamiento digestivo del grano. Desde un punto de vista agronómico los taninos son muy valorados ya que determinan una mayor resistencia a la germinación pre-cosecha y al ataques de hongos, insectos y pájaros, lo que determina un mayor rendimiento del cultivo (Reed, 1995). Sin embargo, la presencia de taninos se asocia negativamente con la calidad nutricional del grano, fundamentalmente por disminuir su palatabilidad, inhibir el crecimiento y las enzimas bacterianas y por formar complejos con las proteínas que dificultan la digestión del almidón del grano (Hibberd et al. 1982a; Rooney & Pflugfelder, 1986; Reed, 1995). Hibberd et al. (1982a), reportan una menor digestibilidad y producción de gas medidas *in vitro* de sorgos altos en taninos respecto a sorgos bajos en taninos y al maíz. Sin embargo, no encontraron diferencias en los mismos parámetros cuando se incubó el almidón aislado de los distintos granos (Hibberd et al. 1982b), por lo cual concluyen que la digestibilidad del almidón del grano de sorgo podría estar limitada por factores tales como la estructura proteica y los taninos presentes en el grano. En nuestro país,

D'Alessandro et al. (1997) midiendo la digestibilidad de diferentes tipos de sorgo en cerdos comunicó valores llamativamente bajos para los identificados como altos en taninos. Más recientemente, otros trabajos realizados en el Departamento de Nutrición de la Facultad de Veterinaria reportaron menores niveles de degradabilidad ruminal de genotipos altos en taninos respecto a los bajos (Curbelo et al. 2007), resultados que coinciden con los reportados por otros autores (Bianco et al. 2000; Caorsi & Olivera, 2005; Montiel et al. 2011).

### **2.3.3. *Tratamientos para incrementar el valor nutritivo del grano de sorgo***

Debido a las características antes mencionadas, el sorgo es el tipo de grano que muestra mayores respuestas a los tratamientos que se aplican en orden de incrementar su valor nutritivo (Huntington, 1997, Offner et al. 2003). En general, el efecto del procesamiento sobre el aprovechamiento digestivo del grano esta en relación con la alteración que provoca en la estructura del mismo (Offner et al. 2003; Owens & Zinn, 2005). En este sentido, Rooney & Pflugfelder (1986) señalan que para incrementar el valor nutritivo del grano de sorgo para rumiantes, la matriz proteica del endospermo debería ser alterada.

Tratamientos simples como el quebrado y/o molido del grano actúan mediante la ruptura del pericarpio y la exposición del endospermo a la digestión por parte de los microorganismos del rumen y las enzimas digestivas del animal. Es así, que cuanto mayor es la intensidad de este procesamiento mayor es la disminución del tamaño de partícula lo que incrementa la respuesta a este tratamiento (McAllister et al. 1993; Huntington, 1997; Offner et al. 2003). Tratamientos más agresivos aplicados a nivel industrial, generalmente implican la reducción de tamaño de partícula, la gelatinización del almidón o la disrupción de la matriz proteica que rodea a los gránulos de almidón (Offner et al. 2003). En este sentido, el “steam flacked”, tratamiento que involucra la aplicación de vapor y calor seguido de un laminado posterior determina la disrupción de la matriz proteica, un aumento en la solubilidad del almidón e incrementos en el aprovechamiento digestivo de los granos (Rooney & Pflugfelder, 1986; Offner et al. 2003; DePeters et al. 2007). Theurner et al. (1999), estudiando el efecto del “steam flacked” en el aprovechamiento digestivo del grano de sorgo reportan cambios en el sitio de digestión del almidón, con un incremento del 15% en la degradabilidad ruminal y del 2,5% en la digestibilidad total en los granos tratados. En el mismo sentido, Anguita et al. (2006) reportan incrementos en la digestión *in vitro* del almidón de varios tipos de grano cuando éstos fueron sometidos a procesos de cocción por vapor.

Trabajos realizados por nuestro equipo de investigación reportaron un aumento importante en la degradabilidad ruminal y en el aprovechamiento digestivo de los granos de sorgo cuando se los cosecha en un estado de maduración temprana y se los ensila como grano húmedo, respecto a los mismos cuando son utilizados en un estado de maduración tardía como grano seco (Curbelo, 2010). Estos resultados coinciden con los publicados por otros autores, quienes reportaron incrementos en la utilización digestiva del grano de sorgo cuando se los ensila como grano húmedo (Huntington, 1997; Bianco et al. 2000; Caorsi & Olivera, 2005), lo que constituye una ventaja importante al momento de utilizar el grano como alimento en rumiantes. Dado que el estado de madurez influye sobre la degradabilidad ruminal de los cereales, el incremento en el valor nutritivo por el ensilaje de sorgo como grano húmedo conlleva los efectos de la cosecha temprana del grano y del proceso de ensilaje. Akbar et al.

(2002), estudiando seis variedades de grano de maíz encontraron que la degradabilidad ruminal de la materia seca del grano disminuía a medida que aumentaba el grado de madurez al momento de la cosecha. En el mismo sentido, Montiel y Elizalde (2004) reportan una mayor degradabilidad de la materia seca de sorgos altos en taninos cuando fueron cosechados con 35% de humedad respecto a los cosechados con 25%. A su vez, el proceso de ensilaje que se desarrolla durante el almacenamiento anaerobio del grano húmedo también tiene efecto en esta respuesta. En este sentido, trabajos desarrollados por nuestro equipo de investigación que estudiaron el efecto del proceso de ensilaje sobre la composición química, la fermentación *in vitro* y el sitio de digestión de granos de sorgos cosechados húmedos, reportaron que el proceso de ensilaje determinó una disminución en la concentración de taninos condensados y de proteína, una mayor fermentación *in vitro* y cambios en el sitio de digestión de los grano húmedos (Curbelo, 2010; Torterolo et al. 2012). Luego del proceso de ensilaje, los gránulos de almidón quedan más susceptibles al ataque de las enzimas microbianas debido a una disrupción de la matriz proteica del grano (Owens & Zinn, 2005)

La reconstitución del grano de sorgo cosechado seco, que conlleva el remojado del grano para reconstituir su humedad y el almacenamiento anaeróbico, es un tratamiento de bajo costo que puede incrementar el valor nutritivo del sorgo (Simpson et al. 1985, Rooney & Pflugfelder, 1986, Hill et al. 1991). El reconstituido causa una degradación fermentativa de la matriz proteica que rodea los gránulos de almidón en el endospermo periférico dejando disponibles éstos para la digestión (Rooney & Pflugfelder, 1986). Según Pflugfelder et al. (1986), la reconstitución del grano de sorgo sin una fase aerobia difícilmente resulte en alteraciones físicas o químicas que puedan incrementar el valor nutritivo del grano. La activación del proceso de germinación en el grano llevaría a la hidrólisis de parte de la matriz proteica, lo que repercutiría en mejoras de la digestión del almidón (Pflugfelder et al. 1986). Sin embargo, los procesos que determinan el incremento del valor nutritivo de los granos reconstituidos no están del todo claros. Mientras algunos autores sugieren que el remojado del grano es el factor que determina la respuesta (Simpson et al. 1985), otros no reportan efecto del remojado o el remojado y ensilado del grano sobre su composición química, degradabilidad ruminal o fermentación *in vitro* (Balagun et al. 2005). De acuerdo con algunos autores, un período corto de germinación previo al almacenaje anaeróbico del grano reconstituido acelera la fermentación bacteriana lo cual resulta en mejoras en la digestibilidad del sorgo para rumiantes (Pflugfelder et al. 1986, Balagun et al. 2005). Sin embargo, otros autores reportan un incremento en la degradabilidad y en la digestibilidad total de granos de sorgo reconstituidos y ensilados, sin germinación previa (Hill et al. 1991).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El uso del grano de sorgo en Uruguay ha tenido un crecimiento constante. La siembra total pasó de 122 mil hectáreas y 373 mil toneladas producidas en la zafra 2005-2006 a 250 mil hectáreas y 910 mil toneladas producidas en la zafra 2010-2011 (Methol, 2013). Dado que más del 95% del grano de sorgo producido en Uruguay se consume a nivel interno (Methol, 2013), el crecimiento y la magnitud de su producción ponen en evidencia la importancia que ha adquirido este cultivo dentro de la intensificación de los sistemas de producción pecuarios. En este sentido, su relación de precios con otros granos, su mayor resistencia a problemas climáticos y al ataque de insectos y hongos, lo hacen una alternativa muy interesante para la suplementación de animales en pastoreo.

Observaciones empíricas comunicadas por asesores y productores, indican que los resultados que se obtienen con la suplementación de ovinos consumiendo pasturas templadas de buena calidad no siempre van en la misma dirección, o son de la misma magnitud, que las obtenidas en bovinos. Estas diferencias podrían estar fundamentadas en una diferente utilización digestiva de la dieta por parte de bovinos y ovinos, como lo han reportado diversos trabajos realizados con animales consumiendo dietas totalmente mezcladas donde el suministro de concentrados se hace mezclado con forrajes conservados (Mertens & Ely, 1982; Colucci et al. 1989; Colucci et al. 1990; De Boever et al. 1990; Südekum et al. 1995). Sin embargo, el manejo de la alimentación usado en la mayoría de los sistemas semi-intensivos e intensivos de Uruguay basado en el uso de forraje fresco donde la suplementación con concentrado se realiza una o dos veces al día separado del forraje podría tener efecto en la respuesta diferencial entre especies. Ésto, junto a la importancia que ha tenido el uso de grano de sorgo en la intensificación de los sistemas de producción, determina la necesidad de generar información que permita evaluar de forma comparativa la respuesta a la suplementación con grano de sorgo en bovinos y ovinos consumiendo pasturas frescas, de forma tal de generar recomendaciones específicas para cada especie.

Trabajos realizados a nivel nacional, evaluando el efecto de períodos cortos de suplementación sobre el desempeño reproductivo de vacas u ovejas manejadas en campo natural, demuestran un incremento en las concentraciones plasmáticas de glucosa e insulina como consecuencia de la suplementación (Viñoles et al. 2005; Astessiano et al. 2013). Sin embargo, en la bibliografía consultada no hay estudios que relacionen los efectos de la suplementación con granos sobre el consumo y la digestión de nutrientes, con los efectos provocados por la suplementación sobre el metabolismo de la glucosa de bovinos y ovinos consumiendo pasturas, con lo que surge la necesidad de generar información en este sentido.

La cosecha temprana y el ensilaje como grano húmedo es una alternativa de bajo costo que ha demostrado tener efectos positivos en incrementar el valor nutritivo del sorgo (Huntington, 1997; Bianco et al. 2000; Caorsi & Olivera 2005; Curbelo, 2010). Sin embargo, una parte muy importante del sorgo que se comercializa en Uruguay es bajo la forma de grano seco. Esto lleva a la necesidad de profundizar en alternativas de tratamientos que aplicadas sobre granos cosechados en un estado de maduración tardía tengan impacto en incrementar el valor nutritivo del grano. En este sentido, la reconstitución del grano seco, que conlleva el remojo del grano para reconstituir su humedad y el almacenamiento anaeróbico, es un tratamiento de bajo costo que puede

incrementar el valor nutritivo del sorgo (Simpson et al. 1985, Rooney & Pflugfelder, 1986, Hill et al. 1991). Sin embargo, sus efectos no son consistentes y los procesos que determinan el incremento del valor nutritivo de los granos reconstituidos no están del todo claros. Ésto lleva a la necesidad de profundizar en el conocimiento de este tratamiento y de conocer los efectos potenciales que tienen para mejorar el valor nutritivo del grano de sorgo los procesos involucrados en la reconstitución del grano, de modo de optimizar la respuesta a este tratamiento.

#### **4. HIPÓTESIS**

La suplementación con grano de sorgo a bovinos y ovinos consumiendo una pastura fresca mejorará el consumo y el aprovechamiento digestivo de la dieta, lo que estará asociado a cambios en el metabolismo de la glucosa.

Los efectos de la suplementación sobre el consumo y el aprovechamiento digestivo estarán influidos, tanto por el nivel de inclusión del grano en la dieta como por la especie suplementada. Las diferencias en capacidad de digestión entre especies serán más evidentes a mayor nivel de inclusión del grano, donde los ovinos presentarán mayores valores de digestibilidad que los bovinos.

La mejora en el aprovechamiento digestivo de los granos de sorgo también dependerá del tratamiento realizado sobre los mismos luego de su cosecha. En este sentido, los granos secos tratados con una combinación de aumento del nivel de humedad, germinación y posterior fermentación (ensilaje) serán los que muestren mayores aumentos en la digestión ruminal e intestinal.

#### **5. OBJETIVOS**

Comparar los efectos de la especie animal y del nivel de suplementación con grano de sorgo sobre el consumo, la digestibilidad y los parámetros de fermentación ruminal de bovinos y ovinos consumiendo una pastura fresca.

Evaluar el efecto de la suplementación con grano de sorgo en bovinos y ovinos consumiendo una pastura fresca sobre el metabolismo de la glucosa.

Evaluar la relación entre el consumo y la digestión de los nutrientes con los cambios endocrino-metabólicos vinculados al uso de la glucosa en bovinos y ovinos consumiendo una pastura fresca de buena calidad y suplementados o no con grano de sorgo.

Evaluar el efecto de distintos tratamientos, tendientes a mejorar el aprovechamiento digestivo de granos de sorgo cosechados secos, sobre la composición química, la fermentación *in vitro* y el sitio de digestión de los granos en rumiantes.

## 6. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

En base a las hipótesis y objetivos planteados, la presente Tesis de Doctorado comprende 3 experimentos. Los experimentos I y II se realizaron en simultáneo con los mismos animales y manejo de la alimentación, mientras que el experimento III se realizó a posteriori de forma separada.

En el *Experimento I* se comparó, entre bovinos y ovinos consumiendo una pastura fresca *a voluntad*, el efecto de la suplementación con niveles crecientes de grano de sorgo sobre el consumo de forraje y de la dieta total, la digestibilidad de las diferentes fracciones del alimento, la síntesis de proteína microbiana en rumen y su eficiencia y las dinámicas de pH y de la concentración de ácidos grasos volátiles y amoníaco en rumen. Como resultado de este experimento se publicó un artículo en la revista internacional arbitrada *Animal Feed Science and Technology* (Artículo I en el Anexo):

**Aguerre M., Cajarville C., Kozloski G.V., Repetto J.L. (2013).** Intake and digestive responses by ruminants fed fresh temperate pasture supplemented with increased levels of sorghum grain: a comparison between cattle and sheep. *Animal Feed Science and Technology*. 186: 12-19.

En el *Experimento II* se evaluó, en bovinos y ovinos consumiendo una pastura fresca *a voluntad*, el efecto de la suplementación con grano de sorgo sobre la concentración plasmática de glucosa, insulina y glucagón y la concentración hepática de ARNm del receptor de insulina y de las enzimas *piruvato carboxilasa (PC)* y *fosfoenolpiruvatoe carboxikinasa (PCK1)*. A su vez, se buscaron asociaciones de estas variables con el consumo y digestión de los nutrientes. Como resultado de este experimento se publicó un artículo en la revista internacional arbitrada *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* (Artículo II en el Anexo):

**Aguerre M., Carriquiry M., Astessiano A.L., Cajarville C., Repetto J.L. (2015).** Effect of sorghum grain supplementation on glucose metabolism in cattle and sheep fed temperate pasture. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 99: 465–473.

En el *Experimento III* se evaluó el efecto de la adición de agua *per se*, el proceso de germinado, del proceso de ensilaje o su asociación sobre la composición química, la degradabilidad ruminal, la digestibilidad intestinal, la digestibilidad en todo el tracto digestivo y la dinámica de fermentación *in vitro* de granos de sorgo cosechados seco. Como resultado de este experimento se publicó un artículo en la revista internacional arbitrada *Animal Feed Science and Technology* (Artículo III en el Anexo).

**Aguerre M., Cajarville C., Repetto J.L. (2015).** Impact of water addition, germination, ensiling and their association on sorghum grain nutritive value. *Animal Feed Science and Technology*. 205: 75-81.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

Los trabajos de campo de los tres experimentos presentados se realizaron en la Unidad de Digestión y Metabolismo Ruminal de los Departamentos de Nutrición y Bovinos (Campo Experimental N° 2, San José, Uruguay) de la Facultad de Veterinaria, UdelaR. Los análisis de composición química de los alimentos (*Experimentos I, II y III*), de las heces (*Experimento I*), de los residuos de la incubación ruminal e intestinal (*Experimento III*) y la determinación de glucosa en plasma (*Experimento II*) se realizaron en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Veterinaria, UdelaR, Montevideo, Uruguay. Las determinaciones de derivados púricos en orina (*Experimento I*) fueron realizadas en el Laboratorio de Bromatología y Nutrición de Rumiantes de la Universidad Federal de Santa María, Río Grande del Sur, Brasil. Las determinaciones de Acetato, Propionato y Butirato en el líquido ruminal (*Experimento I*) se determinaron en el Departamento de Neuroquímica del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay. Las determinaciones de insulina, glucagón y de la expresión hepática de genes vinculados al metabolismo de la glucosa (*Experimento II*) fueron determinados en el Laboratorio de Técnicas Nucleares de la Facultad de Veterinaria, UdelaR, Montevideo, Uruguay. Los protocolos experimentales se desarrollaron siguiendo las recomendaciones de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (UdelaR, Montevideo, Uruguay).

### 7.1. Diseño experimental y muestreos

#### 7.1.1. Experimentos I y II:

Como se mencionó anteriormente los *Experimentos I y II* fueron realizados de forma simultánea. Para la realización del *Experimento I* se utilizaron 24 vaquillonas Hereford x Aberdeen-Angus ( $210 \pm 42,5$  kg de peso vivo (PV), media  $\pm$  desvío estándar) y 24 capones Corriedale x Milchschaf ( $45,6 \pm 6,2$  kg de PV), los cuales fueron bloqueados por PV y dentro de cada bloque asignados al azar a uno de cuatro tratamientos ( $n = 6$  de cada especie por tratamiento): no suplementados (S0) o suplementados con grano de sorgo molido a razón de 5, 10 o 15 g/kg de su PV (S5, S10 y S15, respectivamente). Para la realización del *Experimento II* se utilizaron la totalidad de los bovinos y ovinos incluidos en los tratamientos S0 y S15.

Para cada especie, a cuatro de los seis animales incluidos en cada tratamiento, se le implantó quirúrgicamente una sonda ruminal. Mientras que, a todos los bovinos y ovinos incluidos en los tratamientos S0 y S15 se les implantó un catéter yugular (Introcan<sup>®</sup>, B. Braun Melsungen AG, Germany). Los animales fueron alojados en jaulas metabólicas (2,20 x 0,80 m para los bovinos y 1,10 x 0,55 m para los ovinos) y alimentados con una pastura fresca compuesta por 91% de *Lotus corniculatus* un 5,0% de *Lolium multiflorum* y un 4,0% de resto seco. La pastura fue cortada diariamente y ofrecida *a voluntad*. El grano de sorgo molido fue suministrado separado del forraje, en dos comidas iguales a las 08:00 y a las 20:00 h. La composición química de los alimentos se presenta en el Cuadro 1 y la composición química de las dietas resultantes para cada especie en los tratamientos S0 y S15 se presenta en el Cuadro 2. De acuerdo con el National Research Council (NRC, 1996 y 2007), el consumo de energía metabólica para los bovinos y ovinos del tratamiento S0 fue un 174 y 216% del requerimiento para mantenimiento, mientras que para los animales del tratamiento S15

fue un 257 y 203% del requerimiento de mantenimiento, bovinos y ovinos, respectivamente.

**Cuadro 1:** Composición química<sup>a</sup> de la pastura y el grano de sorgo (*Experimento I*)

Item	Pastura	Grano de sorgo
MS (g/kg)	318 ± 2,5	913 ± 2,8
Composición, (g/kg MS)		
MO	932 ± 1,0	988 ± 0,1
FND	418 ± 7,5	192 ± 3,67
FAD	288 ± 3,4	64,2 ± 1,43
LAD	139 ± 1,5	36,8 ± 0,58
EE	18,1 ± 0,78	21,3 ± 1,31
Almidón	30,5 ± 1,32	661 ± 2,4
N total	20,2 ± 0,48	10,0 ± 0,50
Fracciones de N (proporción del N total)		
N soluble	0,21 ± 0,0072	0,13 ± 0,0060
NDIN	0,18 ± 0,0021	0,13 ± 0,0054
ADIN	0,12 ± 0,0048	0,07 ± 0,0005

<sup>a</sup>MS, material seca; MO, material orgánica; FND, fibra neutro detergente; FAD, fibra ácido detergente, LAD, lignina ácido detergente; EE, extracto etéreo; N total, nitrógeno total; N soluble, nitrógeno soluble en buffer fosfato; NDIN, nitrógeno insoluble en detergente neutro; ADIN, nitrógeno insoluble en detergente ácido. Los datos se presentan como las medias ± EEM ( $n = 22$  para la pastura y  $n = 2$  para el grano de sorgo). El grano de sorgo tenía 8,0 g/kg MS de taninos totales y 5,4 g/kg DM de taninos condensados.

El período experimental fue de 33 días, durante los primeros 21 días se realizó la adaptación de los animales a la dieta y a las condiciones experimentales, entre el día 22 y 32 se realizaron las mediciones y muestreos del *Experimento I* y el día 33 se realizaron los muestreos del *Experimento II*. Durante la adaptación, los animales recibieron niveles crecientes de grano de sorgo hasta llegar a la cantidad asignada para cada animal y tratamiento. El forraje ofrecido y rechazado fue pesado diariamente entre los días 22 y 32 del *Experimento I*. El forraje ofrecido se muestreó diariamente, mientras que el forraje rechazado sólo se muestreó cuando representó más de 200 g/kg del ofrecido. Durante los experimentos se utilizó una única partida de grano de sorgo molida, la cual se muestreó el día 1 y 32. Para cada animal, la totalidad de las heces y orina emitidas fueron colectadas, pesadas y muestreadas diariamente entre los días 27 y 32 del *Experimento I*. La orina fue colectada en recipientes plásticos conteniendo 100 o 200 ml de ácido sulfúrico 1,6 M para ovinos y bovinos, respectivamente. Las muestras del alimento ofrecido, rechazado y de las heces fueron secadas a 60°C hasta peso constante y molidas a 1 mm para su posterior análisis. El día 32 del *Experimento I*, se colectaron muestras de líquido ruminal a cada hora entre la hora 0 y 6 luego de la suplementación de la mañana. El pH del líquido ruminal se midió inmediatamente con un pH metro digital (EW-05991-36, Cole Parmer, Vernon Hills, IL, USA), y dos muestras de 10 mL fueron conservadas. Una de las muestras se conservó con 50 µL de ácido sulfúrico (98% de pureza) para la posterior determinación de ácidos grasos volátiles (AGV) y la otra con 10 mL de una solución de 200 g/L de NaCl para la posterior determinación de N-NH<sub>3</sub>. Estas muestras fueron almacenadas a -18°C hasta su análisis. El día 33, se tomaron muestras de sangre y biopsias hepáticas a los todos los animales incluidos en el *Experimento II*. Las muestras de sangre se colectaron cada 2 horas entre la hora 0 y 6 luego de la suplementación de la mañana en tubos con fluoruro

de potasio y EDTA trisódico (Anticoagulante G, Wiener Laboratorios S.A.I.C., Montevideo, Uruguay). Inmediatamente las muestras de sangre se centrifugaron (3000 rpm, 15 min) y el plasma obtenido se almacenó a -18°C. Las biopsias de hígado (aproximadamente 500 mg) se obtuvieron usando una aguja biopsiadora (Tru-Core ®-II Automatic Biopsy Instrument, Angiotech, Lausanne, Switzerland) de acuerdo a la metodología descrita por Astessiano et al. (2012). Las muestras de hígado fueron inmediatamente almacenadas en nitrógeno líquido y luego almacenadas a -80°C hasta su procesamiento.

**Cuadro 2:** Composición química<sup>a</sup> y concentración de energía metabólica de las dietas consumidas por bovinos y ovinos (*Experimento II*)

Item	S0 <sup>b</sup>		S15 <sup>c</sup>		EEM <sup>d</sup>
	bovinos y ovinos		bovinos	ovinos	
MS (g/kg)	318		556	585	15
Composición, (g/kg MS)					
MO	932		955	957	1,4
FND	418		327	316	5,5
FAD	288		198	187	5,5
Almidón	30,5		272	301	15
N total	20,2		16,0	15,5	0,23
MO digestible	631		704	734	18
Energía metabólica estimada (kcal/kg MS) <sup>e</sup>	2289		2400	2636	--

<sup>a</sup> MS, material seca; MO, material orgánica; FND, fibra neutro detergente; FAD, fibra ácido detergente, N total, nitrógeno total; MO digestible, materia orgánica digestible.

<sup>b</sup> Sin suplementación.

<sup>c</sup> Suplementados a razón de 15 g/kg de su PV

<sup>d</sup> error estándar de la media (n = 24)

<sup>e</sup> estimada de acuerdo a NRC (1996, 2007)

### 7.1.2. Experimento III:

Para la realización del *Experimento III* se utilizaron cinco muestras de sorgo obtenidas de chacras comerciales al momento de su cosecha como grano seco. En el momento previo a la cosecha se colectaron tres muestras de grano de diferentes partes de cada chacra para determinar su composición química (los datos se presentan en el Cuadro 3). Luego de la cosecha sobre el grano de cada una de las chacras se evaluaron seis tratamientos (n = 5 por tratamiento): molido seco (seco, control), remojado por 24 horas (Rem), germinado por 5 días (G), germinado por 5 días y luego ensilado por 21 días (G&E), ensilado por 21 días con el grano entero (E.ge) o ensilado por 21 días con el grano previamente molido (E.gm). Para el tratamiento remojado cantidades iguales de grano y agua fueron mezclados por 24 horas, luego el exceso de agua fue drenada y el grano congelado. Para la realización de los tratamientos germinado, germinado y ensilado, y ensilado con el grano entero la humedad de los granos enteros fue reconstituida hasta 300 g/kg mediante el agregado de agua y luego las muestras fueron almacenadas en aerobiosis por 5 días, en aerobiosis por 5 días y luego en anaerobiosis por 21 días o en anaerobiosis por 21 días, respectivamente. Para los tratamientos molido seco (control) y ensilado con el grano molido, el grano fue molido en un molino de martillo (JF 2D, JF Máquinas Agrícolas Ltda, Itapira, SP, Brasil) con una zaranda de 3 mm. Luego, en el tratamiento E.gm se reconstituyó la humedad del grano molido hasta 300 g/kg mediante el agregado de agua y se almacenó en anaerobiosis por 21 días.

Todos los tratamientos se realizaron en recipientes plásticos en un cuarto oscuro y a 20°C. En los tratamientos que incluyeron ensilaje, el mismo se realizó en recipientes de 5 L de capacidad, el grano se comprimió con una prensa manual y el recipiente se cerró con tapa hermética por 21 días para asegurar un correcto proceso de fermentación y la estabilización de los silos. Luego de abierto los recipientes, el pH de los ensilajes fue medido inmediatamente usando un pH metro digital (EW-05991-36, Cole Parmer, Vernon Hills, IL, USA) tras diluir 10 g de grano en 100 mL de agua destilada. Los tratamientos remojado, germinado, germinado y ensilado, ensilado con el grano entero y ensilado con el grano molido se realizaron por triplicado para cada muestra de sorgo. No se detectaron pérdidas significativas de MS como consecuencia de los tratamientos. Luego de realizado los tratamientos las muestras fueron secadas a 60°C hasta peso constante y molidas a 1 mm para su posterior procesamiento.

**Cuadro 3:** Composición química<sup>a</sup> de las muestras de grano de sorgo<sup>b</sup> (*Experimento III*)

	1	2	3	4	5
MS, (g/kg)	897±2,2	892±1,6	898±0,1	891±0,3	899±1,0
Composición, (g/kg MS)					
MO	987±0,5	986±0,4	988±0,1	985±0,1	987±0,3
Almidón	724±1,8	660±12,5	684±4,7	727±5,8	732±5,5
N total	13,7±0,41	12,6±0,51	12,9±0,49	13,8±0,58	14,0±0,25
FND	76,9±5,74	138±13,1	112±10,8	111±4,6	159±21,6
FAD	25,2±2,19	47,9±1,24	51,9±0,02	37,7±2,82	49,8±3,50
TC	0,943±0,8623	9,49±0,579	13,0±0,38	0,688±0,4833	9,85±0,533

<sup>a</sup> MS, material seca; MO, material orgánica; N total, nitrógeno total; FND, fibra neutro detergente; FAD, fibra ácido detergente; TC, taninos condensados. <sup>b</sup>muestras 1, 2, 3, 4 y 5 fueron de la variedad Joward Food, 3034, Flash 1, Flash 10 y BMR 1000, IPB®, San José, Uruguay, respectivamente. Los datos son presentados como las medias ± desvío estándar (n = 3).

## 7.2. Procedimientos y determinaciones

### 7.2.1. Experimento I:

El consumo total de alimento y de forraje se determinó como la diferencia entre el alimento ofrecido y rechazado en 24 horas. La tasa de sustitución se determinó como la relación entre la diferencia en consumo de forraje de los animales no suplementados y suplementados en cada especie y el consumo de grano. La digestibilidad aparente de la MS, MO, almidón, FND, FAD y nitrógeno se determinó como la relación entre la fracción digerida (no eliminada en heces) y el consumo.

La síntesis de proteína microbiana en rumen se estimó por métodos indirectos a través de la determinación de la excreción de derivados púricos en orina. La cantidad de purinas totales absorbida correspondiente a la cantidad de derivados púricos excretados (considerando 150 mg de alantoina/mmol y 168 mg de ácido úrico/mmol) se calculó de acuerdo a la relación propuesta por Chen & Gomes (1992). La producción de nitrógeno microbiano (NM, g/d) fue estimado asumiendo una digestibilidad de las purinas microbianas de 83%, un contenido de N en las purinas de 70 mg/mmol y una relación N de purinas/N microbiano de 0,116 (Chen & Gomes, 1992). La eficiencia de síntesis de la proteína microbiana se estimó como los g de N microbiano por kg de MO digestible ingerida.

### 7.2.2. Experimento II:

La extracción del ARN total de las muestras de hígado se realizó usando TRIzol (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA), seguido de una precipitación con cloruro de litio y un tratamiento con Dnasa (Dnase-Free™ Kit; Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX, USA) para eliminar el ADN contaminante. La concentración de ARN total aislado se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer; Nanodrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA) y la calidad del mismo se evaluó según las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230 (NanoDrop) y mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. El ARN así aislado fue almacenado a -80°C hasta su posterior cuantificación por PCR en tiempo real.

La retrotranscripción se realizó utilizando un kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System Kit (Invitrogen) con hexámeros no específicos y 1 µg de ARN. Los primers usados (Cuadro 4) para la amplificación específica del ADNc del receptor de insulina (*INSR*), de la *piruvato carboxilasa* (*PC*), y de la *fosfoenolpiruvato carboxikinasa* (*PCK1*) como genes de interés y de la *hipoxantina fosforribosiltransferasa* (*HPRT*) como control endógeno fueron obtenidos de la literatura (Carriquiry et al. 2009; Astessiano et al. 2012) o diseñados con Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000).

**Cuadro 4:** Primers usados para la amplificación específica del ADNc del receptor de insulina (*INSR*), de la *piruvato carboxilasa* (*PC*), de la *fosfoenolpiruvato carboxikinasa* (*PCK1*) y de la *hipoxantina fosforribosiltransferasa* (*HPRT*) (Experimento II)

Gen*	Nº Acceso <sup>a</sup>		Secuencia de Primerse	Largo (bp)	Eficiencia (%) <sup>b</sup>	r <sup>2</sup> <sup>c</sup>
<i>INSR</i>	XM_590552.4	Sentido	CTGAAGCCAAGGCAGATGATATT	77	104	0,977
		Antisentido	GCCACATCAAGTGAACAACGTT			
<i>PC</i>	NM_177946.3	Sentido	CGTCTTTGCCCACTTCAAGGGAA	70	95	0,939
		Antisentido	GAGGCGCGTATTGAGGC			
<i>PCK1</i>	NM_174537.2	Sentido	TGGCCATGATGAACCCTACTCGT	77	110	0,989
		Antisentido	CAAATTTTCATCCAGGCATATC			
<i>HPRT</i>	XM_580802	Sentido	TGGAGAAGGTGTTTATTCCTCATG	105	99	0,933
		Antisentido	CACAGAGGGCCACAATGTGA			

<sup>a</sup> Secuencias del GeneBank

<sup>b</sup> Eficiencia de las curvas estándar

<sup>c</sup> r<sup>2</sup> de las curvas estándar

La reacción de PCR en tiempo real se realizó usando 10µL de SYBR Green® mastermix (Quantimix EASY SYG kit; Biotools B&M Labs, Madrid, Spain), la misma cantidad (200nM) de primers sentido y antisentido (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA), y 3 µL de ADNc diluido (1:7.5 en Rnasa / Dnasa libre de agua) en un volumen final de 20 µL. Para cada gen, las muestras fueron analizadas por duplicado en un único ensayo de PCR en tiempo real en un disco de 72 – Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Life Sciences, Sidney, Australia). Las condiciones de amplificación fueron de 10 min a 95°C y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 45 segundos a 60°C y 20 segundos a 72°C. Luego del último ciclo se generaron curvas de disociación para verificar la presencia de un único producto de PCR. Cada disco incluyó un duplicado con agua y un estándar de ADNc para los genes analizados en la corrida. Para la cuantificación absoluta de los transcriptos se generaron curvas estándar (n = 6 de 10<sup>6</sup> a 10<sup>1</sup> copias de gen/µL) utilizando plásmidos que codificaban los genes de interés y el control endógeno. Para la estimación del número de copias de ARNm de las muestras se usaron regresiones lineales. La expresión de cada uno de los genes de interés se normalizó a la

expresión del control endógeno (Carriquiry et al. 2009). La expresión de *HPRT* no difirió entre tratamientos. Los coeficientes de variación intraensayo fueron 7,5, 12,2, 17,6% y 13,6%, para *INSR*, *PC*, *PCK1* y *HPRT*, respectivamente.

### 7.2.3. Experimento III:

La degradación ruminal y la digestibilidad intestinal *in situ* de la MS y del almidón se determinaron usando tres novillos Holando ( $405 \pm 10,3$  kg de PV, media  $\pm$  desvío estándar) canulados en saco dorsal de rumen y duodeno proximal. Los animales fueron alimentados con una dieta compuesta (base seca) por dos partes de henolaje de avena (94,0 g/kg proteína bruta (PB), 540 g/kg FND y 342 g/kg FAD, base seca) y una parte de un concentrado compuesto en base a sorgo (226 g/kg PB, 175 g/kg FND y 68,7 g/kg FAD, base seca). La dieta total contenía en base seca, 138 g/kg PB, 415 g/kg FND y 251 g/kg FAD. El alimento fue distribuido a un nivel de consumo de 70 g MS/kg PV<sup>0.75</sup>, en dos veces al día. Muestras de sorgo (5 g, secadas a 60°C hasta peso constante y molidas a 1 mm) de cada tratamiento y repetición fueron introducidos por duplicado en bolsas de nylon (10.5  $\times$  21 cm; 52  $\mu$ m de tamaño de poro, ANKOM Technology Corp., Fairport, NY, USA). Luego de 14 días de adaptación a la dieta, las bolsas fueron incubadas en el rumen de los animales por 16 h. Se realizaron dos series de incubación ruminal en cada novillo en días diferentes. El tiempo de incubación en rumen (16 h) se seleccionó para simular el tiempo de retención de este tipo de alimentos en rumen (Simpson et al., 1985). Luego de cada serie de incubación, las bolsas fueron removidas del rumen y lavadas en forma manual con agua corriente por 5 min y congeladas. Una vez realizadas las dos series de incubación en rumen todas las bolsas fueron descongeladas y lavadas nuevamente con agua corriente, luego todas las bolsas fueron secadas en condiciones similares (60°C hasta peso constante). Para la digestibilidad intestinal 0,2 gramos del residuo de la incubación ruminal se colocó en bolsas de nylon de 3  $\times$  2 cm y 52  $\mu$ m de tamaño de poro. Todas las bolsas de intestino fueron incubadas por 2,5 h a 39°C en una solución de HCl 0,1 M conteniendo 3 g/L de pepsina (Sigma P7125; Sigma, St. Louis, MO, USA) para simular la digestión abomasal y secadas nuevamente (60°C hasta peso constante). Luego de este tratamiento, 32 bolsas por animal y por día fueron introducidas en duodeno con espacios de 15 min entre cada una. Las bolsas móviles fueron colectadas en heces, lavadas de forma manual y congeladas. Luego que todas las bolsas intestinales fueron recolectadas se descongelaron, se lavaron nuevamente con agua corriente y se secaron bajo las mismas condiciones (60°C hasta peso constante). La degradabilidad ruminal y la digestibilidad intestinal de la MS y del almidón se calculó como el porcentaje del material desaparecido luego de la incubación. La digestibilidad en todo el tracto digestivo de estas fracciones se calculó como la suma de la degradación ruminal y la digestibilidad intestinal.

La producción de gas *in vitro* se estimó de acuerdo con Mauricio et al. (1999). Se realizaron dos tandas consecutivas. En cada tanda, cinco muestras de sorgo seco (una de cada chacra) y 15 muestras de sorgo de cada tratamiento (una de cada chacra y repetición), secadas a 60°C hasta peso constante y molidas a 1 mm, fueron pesadas (0,5 g) en un frasco de fermentación de 125 ml (total 80 frascos). A cada frasco se agregó un volumen 40,5 mL de medio (Mould et al. 2005). Luego los frascos se taparon con un tapón de goma y se refrigeraron (4°C) por 12 h para hidratar el sustrato. Inmediatamente antes de la incubación, los frascos se colocaron al azar en un baño maría a 39°C donde permanecieron durante todo el período de medición. En ese momento se agregaron tres frascos únicamente con el medio como blancos. De los mismos tres novillos,

consumiendo la misma dieta, que se usaron para determinar el sitio de digestión, se recolectó líquido ruminal 4 h después de la suplementación de la mañana. El líquido ruminal fue pooleado y usado inmediatamente luego de su extracción. En cada frasco de fermentación se agregó 10 mL de líquido ruminal, luego se taparon con tapón de goma y precinto de aluminio. Todas las manipulaciones se realizaron bajo una corriente de CO<sub>2</sub>. La presión de gas fue medida a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 48, 72 y 96 h luego de la inoculación usando un manómetro digital (Sper Scientific Ltd., Scottsdale, USA) y registrada en unidades psi. Luego de cada medición se permitió el escape del gas acumulado. El volumen de gas (V, mL) fue estimado usando la presión (P, psi) de acuerdo a la ecuación:  $V = 4.40 P + 0.09 P^2$  ( $R^2=0.998$ ), obtenida en una calibración previa realizada en las mismas condiciones. El volumen de gas acumulado durante la fermentación se relacionó a la MS incubada y los datos fueron ajustados al modelo propuesto por Groot et al. (1996). La tasa máxima de fermentación ( $R_{max}$ ; mL/h) y el tiempo a la cual ocurrió ( $T_{max}$ ; h) fueron calculados de acuerdo con Bauer et al. (2001).

### 7.3. Análisis de laboratorio

Las muestras del alimento ofrecido, rechazado y de las heces en el *Experimento I* y de sorgo en el *Experimento III* fueron analizadas para determinar su composición. La materia seca (MS) se determinó por secado en estufa de aire forzado a 105°C hasta peso constante (Método 7.003; AOAC, 1997). Las cenizas fueron determinadas por combustión a 600°C por dos horas (Método 7.009; AOAC, 1997) y la materia orgánica (MO) se determinó por diferencia entre la MS y las cenizas. El nitrógeno total fue determinado por el método de Kjeldahl (Método 984.13; AOAC, 1997). La concentración de fibra neutro detergente (FND) se determinó por el método descrito por Mertens (2002) usando alfa amilasa termoestable, los resultados se expresan incluyendo las cenizas residuales. La fibra ácido detergente (FAD) se determinó según el método 973.18 del AOAC (AOAC, 1997). El contenido de almidón en el *Experimento I* se determinó por hidrólisis de la muestra en ácido sulfúrico y posterior análisis de glucosa (Kozloski et al. 1999), mientras que en el *Experimento III* se determinó por hidrólisis enzimática usando un kit comercial (K\_TSTA 07/11, Megazyme International Ireland, Bray, Co. Wicklow, Ireland). Sobre las muestras de pastura y de sorgo en el *Experimento I* se determinó la concentración de lignina ácido detergente por el método 973.18 de AOAC (AOAC, 1997), el extracto etéreo se determinó en un sistema de reflujo con éter etílico por 3 h (extractor de grasa Goldfish, Labconco Corporation, Kansas City, Missouri, USA), la concentración de nitrógeno soluble en buffer fosfato, el nitrógeno insoluble en detergente neutro y el nitrógeno insoluble en detergente ácido fueron determinados de acuerdo con Licitra et al. (1996) y expresados como proporción del nitrógeno total. La concentración de taninos condensados en las muestras de sorgo (*Experimentos I y III*) se determinó según el método descrito por Makkar (2000).

La concentración de alantoína y de ácido úrico en las muestras de orina (*Experimento I*) se determinó según Chen & Gomes (1992). El ácido úrico se determinó usando un kit comercial (LABTEST, Lagoa Santa MG, Brazil). En las muestras de orina de los ovinos, el ácido úrico fue analizado luego que la xantina e hipoxantina fueran convertidas a ácido úrico con una xantina oxidasa. Los derivados púricos totales se determinaron como la suma del ácido úrico y la alantoína.

La concentración de acetato, propionato y butirato en las muestras de líquido ruminal (*Experimento I*) fueron determinadas de acuerdo con Udén & Sjaunja (2009).

Las muestras acidificadas de líquido ruminal fueron centrifugadas a 4°C por 15 min a 30.000xg y analizadas por HPLC usando una columna Rezex ROA-Organic Acid H<sup>+</sup> (8%), 300 × 7.80-mm (Phenomenex, California, USA). La concentración de N-NH<sub>3</sub> en las muestras de líquido ruminal se determinó por destilación directa usando tetraborato de sodio y titulando con HCl 0,05 M (Preston, 1995).

En el *Experimento II*, la concentración de glucosa en plasma se determinó por colorimetría usando un kit comercial (BioSystems S.A., Costa Brava 30, Barcelona España). Las muestras se analizaron por duplicado en un espectrofotómetro Unico serie 1200 (United Products & Instruments, Inc, NJ, USA). El límite de detección fue de 0,23 mg/dL y el coeficiente de variación intraensayo de 5,0%. La concentración de insulina se determinó por radioinmunoanálisis en fase sólida (RIA; Coat-A-Count®, Diagnostic Product Co., Los Angeles, CA, USA). El límite de detección fue de 13,8 pmol/mL y el coeficiente de variación intraensayo para los controles bajo (19,8 pmol/mL), medio (111 pmol/mL) y alto (177 pmol/mL) fue de 6,2, 7,0, y 0,3%, respectivamente. La concentración de glucagón se determinó por radioinmunoanálisis en fase líquida utilizando un kit comercial (Diagnostic Product Co., Los Angeles, CA, EEUU). Todas las muestras fueron corridas en un único ensayo. El límite de detección fue de 1,30 pmol/mL y el coeficiente de variación intraensayo para los controles medio (17,4 pmol/mL) y alto (63,6 pmol/mL) fue de 4,6 y 14,2%, respectivamente.

#### **7.4. Análisis estadístico**

En los tres experimentos los datos fueron analizados usando el procedimiento MIXED del sistema SAS (SAS 9.0V, SAS Institute Inc., Cary, NC). Los resultados se presentan como la media ± el error estándar de la media. Diferencias significativas se declararon cuando  $P \leq 0,05$ , y se consideró una tendencia cuando  $0,05 < P \leq 0,10$ .

##### **7.4.1. Experimento I:**

Los datos de consumo, digestibilidad, síntesis de proteína microbiana, eficiencia de síntesis de proteína microbiana, los valores medios de pH, N-NH<sub>3</sub> y AGV en rumen fueron analizados de acuerdo al modelo:  $Y_{ij} = \mu + E_i + L_j + (E*L)_{ij} + e_{ij}$ , donde  $\mu$  es la media poblacional,  $E_i$  es el efecto fijo de la especie ( $i =$  bovino u ovino),  $L_j$  es el efecto lineal del nivel de suplementación ( $j = 0, 5, 10$  o  $15$  g/kg de PV) tomado como efecto fijo,  $(E*L)_{ij}$  es el efecto fijo de la interacción entre la especie y el nivel de suplementación con grano de sorgo y  $e_{ij}$  es el error residual. El efecto cuadrático del nivel de suplementación fue originalmente incluido en el modelo. Como este efecto no fue significativo para ninguna variable, los datos fueron analizados nuevamente sin incluirlo en el modelo. Cuando la interacción  $(E*L)_{ij}$  fue significativa, el efecto del nivel de suplementación fue analizado dentro de cada especie por regresiones lineales y cuadráticas.

La dinámica de pH, N-NH<sub>3</sub> y AGV en rumen fue analizada como medidas repetidas en el tiempo. Para estas variables el modelo también incluyó el efecto de la hora de muestreo y sus interacciones con la especie y el nivel de suplementación como efectos fijos. La estructura de covarianza fue autorregresiva de orden 1 y se especificó el procedimiento de Kenward-Rogers para ajustar los grados de libertad del denominador.

#### **7.4.2. Experimento II:**

Dentro de cada especie, los datos de concentración plasmática de glucosa, insulina y glucagón fueron analizados como medidas repetidas en el tiempo de acuerdo al modelo:  $Y_{ijk} = \mu + T_i + H_j + B_k + (T*H)_{ij} + e_{ijk}$ , donde  $\mu$  es la media general,  $T_i$  es el efecto fijo del tratamiento ( $i$  = suplementado o no suplementado),  $H_j$  es el efecto fijo de la hora ( $j = 0, 2, 4$  o  $6$  h),  $B_k$  es el efecto aleatorio del bloque ( $k = 1, 2, 3, 4, 5, 6$ ),  $(T*H)_{ij}$  es el efecto fijo de la interacción entre tratamiento y hora y  $e_{ij}$  es el error residual. La estructura de covarianza fue autorregresiva de orden 1 y se especificó el procedimiento de Kenward-Rogers para ajustar los grados de libertad del denominador.

Los datos de expresión del ARNm hepático se analizaron siguiendo el modelo:  $Y_{ij} = \mu + T_i + B_j + e_{ij}$ , donde  $\mu$  es la media general,  $T_i$  es el efecto fijo del tratamiento ( $i$  = suplementado o no suplementado),  $B_j$  es el efecto aleatorio del bloque ( $k = 1, 2, 3, 4, 5, 6$ ) y  $e_{ij}$  es el error residual. La comparación entre medias se realizó por análisis de Tukey.

Los coeficientes de correlación para describir relaciones entre parámetros nutricionales y metabólicos se estimaron usando la media de las mediciones para cada variable por el procedimiento CORR de SAS.

#### **7.4.3. Experimento III:**

Los datos de composición química, sitio de digestión, digestibilidad total y los parámetros de la producción de gas *in vitro* fueron analizados de acuerdo al modelo:  $Y_{ij} = \mu + T_i + P_j + e_{ij}$ , donde  $\mu$  es la media general,  $T_i$  es el efecto fijo del tratamiento ( $i$  = seco, Rem, G, G&E, E.ge, E.gm),  $P_j$  es el efecto aleatorio de la muestra de sorgo ( $j = 1, 2, 3, 4$  o  $5$ ) y  $e_{ij}$  es el error residual. El efecto aleatorio del animal y de la tanda fueron incluidos para el sitio de digestión y para la producción de gas *in vitro*, respectivamente. La comparación entre medias se realizó por análisis de Tukey.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1. EXPERIMENTO I:

#### 8.1.1. Resultados:

La proporción de sorgo en las dietas de los animales suplementados fue similar para ambas especies (Cuadro 5). Expresado como g/kg de  $PV^{0.75}$ , el consumo de MS de los bovinos no suplementados no fue diferente al de los ovinos. Sin embargo, cuando el consumo se expresó como g/kg de PV, los bovinos no suplementados tuvieron menor consumo total de MS y MO que los ovinos ( $P < 0,01$ ). La suplementación afectó de manera diferente el consumo total de MS en ambas especies, tanto cuando se expresó como g/kg de PV o como g/kg de  $PV^{0.75}$  ( $P < 0,01$ , Cuadro 5). Mientras que el incremento en los niveles de suplementación aumentó linealmente el consumo total de MS y MO en bovinos ( $P < 0,01$ ), en los ovinos los disminuyó ( $P \leq 0,02$ ). Independientemente de la forma en que se exprese (g/kg de PV o como g/kg de  $PV^{0.75}$ ), el incremento en los niveles de suplementación disminuyó el consumo de MS y MO de forraje en ambas especies; sin embargo, este efecto fue más pronunciado en ovinos que en bovinos ( $P < 0,01$ ). Debido a que los niveles de suplementación fueron asignados en función del PV, el consumo de sorgo expresado como g/kg de  $PV^{0.75}$  fue mayor y se incrementó más pronunciadamente en los bovinos que en los ovinos. En los bovinos, el consumo total de nitrógeno se mantuvo constante a medida que se incrementó el nivel de suplementación, mientras que, el incremento en los niveles de suplementación llevó a una caída del consumo total de nitrógeno en los ovinos ( $P < 0,01$ ). El incremento en los niveles de suplementación con sorgo afectó de manera diferente el consumo total de fibra en ambas especies. En los bovinos, el consumo total de FND y FAD no se modificó por los tratamientos; sin embargo, en los ovinos el incremento en los niveles de suplementación provocó una caída lineal en el consumo total de estas fracciones ( $P < 0,01$ ). El consumo total de almidón no difirió entre especies y aumentó linealmente con el incremento en los niveles de suplementación ( $P < 0,01$ ). Mientras que el incremento en los niveles de suplementación aumentó linealmente el consumo de materia orgánica digestible (MOD) en los bovinos, en los ovinos el incremento en los niveles de suplementación tendió a disminuir esta variable ( $P = 0,08$ , Cuadro 5). El incremento en los niveles de suplementación con sorgo no afectó la tasa de sustitución en los bovinos ni en los ovinos; sin embargo, los bovinos tuvieron menores tasas de sustitución que los ovinos (0,120 vs. 1,92, EEM = 0,233;  $P < 0,01$ , bovinos y ovinos respectivamente).

La digestibilidad aparente de la MS y de la MO no difirió entre las especies y aumentó de manera similar en los bovinos y ovinos cuando se incrementó el nivel de suplementación (Cuadro 5). Mientras que, el incremento de la suplementación con sorgo no afectó la digestibilidad aparente del nitrógeno en los bovinos, la disminuyó en los ovinos ( $P < 0,01$ ). Aunque la digestibilidad de la FND no varió entre especies y tratamientos, la digestibilidad de la FAD y del almidón se afectó de manera diferente por el aumento de los niveles de suplementación en bovinos y ovinos ( $P \leq 0,03$ ). En los bovinos, el incremento en los niveles de suplementación no afectó la digestibilidad de la FAD y disminuyó linealmente la digestibilidad del almidón ( $P < 0,01$ ). Mientras que en los ovinos, la digestibilidad de la FAD cayó linealmente ( $P < 0,01$ ) y la digestibilidad del almidón permaneció constante en la medida que aumentó el nivel de grano de sorgo en la dieta (Cuadro 5).

**Cuadro 5:** Consumo y digestibilidad de bovinos y ovinos consumiendo una pastura templada y suplementada con grano de sorgo molido a razón de 0, 5, 10 y 15 g/kg de su PV (S0, S05, S10 y S15, respectivamente)

Item	Bovinos				Ovinos				EEM <sup>a</sup>	P <sup>b</sup>			Bovinos P <sup>c</sup>		Ovinos P <sup>d</sup>	
	S0	S05	S10	S15	S0	S05	S10	S15		Especie	Nivel	Especie*Nivel	L	C	L	C
Proporción de grano en la dieta	0	0,146	0,282	0,400	0	0,128	0,299	0,449	0,0118	0,48	<0,01	0,23	<0,01	0,32	<0,01	0,72
Consumo de MS, (g/kg PV <sup>0,75</sup> )																
Total	106	128	131	137	107	93,3	84,0	84,6	2,86	<0,01	0,59	<0,01	<0,01	0,13	0,01	0,27
Forraje	106	109	94,2	82,6	107	81,7	59,3	49,0	3,02	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,17	<0,01	0,27
Sorgo	0,00	18,4	36,7	54,4	0,00	11,6	24,7	35,6	0,442	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,76	<0,01	0,60
Consumo total, (g/kg PV)																
MS	27,8	33,3	33,9	35,5	40,9	35,6	32,3	32,3	1,05	0,08	0,68	<0,01	<0,01	0,24	0,02	0,30
MO	25,8	31,3	32,0	33,8	38,0	33,4	30,5	30,6	0,97	0,09	0,97	<0,01	<0,01	0,24	0,02	0,32
Nitrógeno	3,48	3,87	3,65	3,58	5,13	4,23	3,42	3,20	0,139	0,08	<0,01	<0,01	0,93	0,29	<0,01	0,31
FND	11,5	12,5	11,4	10,9	17,1	13,8	11,2	10,2	0,45	0,02	<0,01	<0,01	0,33	0,29	<0,01	0,29
FAD	7,65	8,18	7,32	6,75	11,3	8,98	6,73	5,72	0,296	0,10	<0,01	<0,01	0,10	0,25	<0,01	0,36
Almidón	0,87	3,88	6,73	9,52	1,23	3,73	6,63	9,15	0,061	0,39	<0,01	0,10	<0,01	0,17	<0,01	0,95
MOD <sup>e</sup>	17,5	22,7	23,0	25,9	26,4	23,2	22,0	23,1	0,65	0,10	0,14	<0,01	<0,01	0,36	0,08	0,11
Consumo de Forraje, (g/kg PV)																
MS	27,8	28,5	24,4	21,5	40,9	31,2	22,7	18,8	1,09	0,07	<0,01	<0,01	<0,01	0,28	<0,01	0,28
MO	25,8	26,5	22,7	20,0	38,0	29,1	21,3	17,4	1,01	0,07	<0,01	<0,01	<0,01	0,28	<0,01	0,31
Nitrógeno	3,48	3,58	3,07	2,71	5,13	3,97	2,88	2,40	0,138	0,06	<0,01	<0,01	<0,01	0,30	<0,01	0,31
FND	11,5	11,8	10,1	8,90	17,1	13,0	9,43	7,64	0,455	0,07	<0,01	<0,01	<0,01	0,30	<0,01	0,29
FAD	7,65	7,88	6,72	5,92	11,3	8,72	6,13	4,87	0,299	0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,28	<0,01	0,36
Tasa de sustitución <sup>f</sup> , (kg MS forraje/kg MS sorgo)	--	-0,224	0,206	0,379	--	2,14	2,00	1,61	0,233	<0,01	0,92	0,17	0,07	0,65	0,49	0,85
Digestibilidad Aparente																
MS	0,636	0,684	0,686	0,692	0,680	0,678	0,706	0,752	0,0123	0,11	<0,01	0,64	0,08	0,34	0,02	0,27
MO	0,677	0,723	0,719	0,736	0,697	0,698	0,723	0,766	0,0094	0,56	<0,01	0,67	0,03	0,45	0,02	0,30
Nitrógeno	0,615	0,648	0,618	0,588	0,676	0,630	0,548	0,551	0,0134	0,42	<0,01	0,04	0,40	0,23	<0,01	0,40
FND	0,410	0,439	0,442	0,445	0,469	0,427	0,418	0,441	0,0184	0,66	0,74	0,24	0,34	0,58	0,51	0,32
FAD	0,354	0,388	0,392	0,361	0,456	0,371	0,336	0,270	0,0216	0,62	0,04	0,03	0,87	0,53	<0,01	0,76
Almidón	0,921	0,901	0,879	0,860	0,969	0,966	0,974	0,979	0,0041	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,55	0,17	0,59

<sup>a</sup> error estándar de la media (n = 24 por especie); <sup>b</sup> nivel de significancia de la especie, del efecto lineal del nivel de la suplementación y de la interacción entre la especie y el nivel de suplementación. <sup>c</sup> nivel de significancia del efecto lineal y cuadrático del nivel de suplementación en bovinos. <sup>d</sup> nivel de significancia del efecto lineal y cuadrático del nivel de suplementación en ovinos. <sup>e</sup> materia orgánica digestible. <sup>f</sup> relación entre la diferencia en consumo de forraje de los animales no suplementados y suplementados en cada especie y el consumo de grano

**Cuadro 6:** pH, concentración de AGV totales, proporción de acetato, propionato y butirato en los AGV totales, relación acetato/propionato, concentración de N-NH<sub>3</sub>, síntesis y eficiencia de síntesis de proteína microbiana en rumen de bovinos y ovinos consumiendo una pastura templada y suplementada con grano de sorgo molido a razón de 0, 5, 10 y 15 g/kg de su PV (S0, S05, S10 y S15, respectivamente)

Item	Bovinos				Ovinos				EEM <sup>a</sup>	P <sup>b</sup>			Bovinos P <sup>c</sup>		Ovinos P <sup>d</sup>	
	S0	S05	S10	S15	S0	S05	S10	S15		Especie	Nivel	Especie*Nivel	L	C	L	C
pH	6,80	6,46	6,09	6,16	6,45	6,14	6,09	5,54	0,080	<0,01	<0,01	0,56	<0,01	0,07	<0,01	0,16
AGV totales, (mmol/L <sup>e</sup> )	70,9	92,4	118	102	90,4	98,5	113	141	6,67	0,12	<0,01	0,43	<0,01	0,04	<0,01	0,25
AGV, (mmol/mol)																
Acetato	0,739	0,705	0,689	0,701	0,684	0,655	0,612	0,603	0,0061	<0,01	<0,01	0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,28
Propionato	0,152	0,152	0,165	0,158	0,211	0,192	0,203	0,203	0,0079	<0,01	0,39	0,80	0,11	0,59	0,82	0,37
Butirato	0,110	0,143	0,147	0,141	0,104	0,152	0,186	0,192	0,0054	0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
A:P <sup>f</sup>	4,95	4,69	4,19	4,55	3,50	3,50	3,26	3,21	0,125	<0,01	0,05	0,84	<0,01	0,08	0,23	0,85
N-NH <sub>3</sub> , (mg/dL)	20,2	20,4	25,4	20,8	37,4	35,4	39,7	36,8	1,55	<0,01	0,47	0,87	0,34	0,36	0,71	0,84
Síntesis de proteína microbiana en rumen, (g de N microbiano/día)	72,3	73,1	91,8	84,3	17,6	12,7	11,9	10,5	1,57	<0,01	0,24	<0,01	0,02	0,72	<0,01	0,32
Eficiencia de síntesis de proteína microbiana en rumen, (g de N microbiano /kgMODI <sup>g</sup> )	19,8	14,8	16,8	15,1	14,1	11,6	12,1	9,29	0,651	<0,01	<0,01	0,95	0,04	0,10	0,02	0,90

<sup>a</sup> error estándar de la media (para pH, AGV totales, Acetato, Propionato, Butirato, A:P y N-NH<sub>3</sub>; n = 112 por especie y para la síntesis de proteína microbiana en rumen y su eficiencia; n = 24).

<sup>b</sup> nivel de significancia de la especie, del efecto lineal del nivel de la suplementación y de la interacción entre la especie y el nivel de suplementación.

<sup>c</sup> nivel de significancia del efecto lineal y cuadrático del nivel de suplementación en bovinos.

<sup>d</sup> nivel de significancia del efecto lineal y cuadrático del nivel de suplementación en ovinos.

<sup>e</sup> AGV totales determinados como la suma del acetato, propionato y butirato.

<sup>f</sup> relación acetato/propionato

<sup>g</sup> g de nitrógeno microbiano por kg de material orgánica digestible ingerida

El incremento en los niveles de suplementación produjo una respuesta similar a nivel de rumen en ambas especies. Mientras que el pH y la relación acetato/propionato disminuyeron, la concentración de AGV totales se incrementó con el nivel de suplementación ( $P < 0,01$ , Cuadro 6). Sin embargo, el pH y la relación acetato/propionato fueron mayores en los bovinos que en los ovinos ( $P < 0,01$ ). Para el pH y la concentración total de AGV no se detectaron interacciones entre la hora post suplementación y el nivel de suplementación o la especie. Sin embargo, ambas variables cambiaron a través del tiempo ( $P = 0,03$ ). El pH ruminal cayó de 6,48 a 6,13 (EEM = 0,080) y los AGV totales aumentaron de 96,5 a 116 mmol/L (EEM = 6,70) de la hora 0 a la 4 post suplementación y se mantuvieron constantes hasta la hora 6. Para la relación acetato/propionato se detectó una interacción entre la hora post suplementación y la especie ( $P = 0,03$ ). Mientras que en los ovinos la relación acetato/propionato se mantuvo constante durante las 6 horas post suplementación, en los bovinos la relación subió entre la hora 0 y 3 post suplementación (4,50 vs. 5,10, EEM = 0,174) para caer a los niveles basales a la hora 6. En ambas especies, la proporción de acetato en los AGV totales disminuyó y la de butirato aumentó con el incremento en los niveles de suplementación, sin embargo estos cambios fueron menos pronunciados en los bovinos que en los ovinos ( $P \leq 0,01$ ). La suplementación no afectó la proporción de propionato en los AGV totales, sin embargo los bovinos tuvieron una proporción menor que los ovinos ( $P < 0,01$ ). La suplementación con grano de sorgo no afectó la concentración de N-NH<sub>3</sub> en rumen, pero los bovinos tuvieron menores concentraciones de N-NH<sub>3</sub> que los ovinos ( $P < 0,01$ ). La producción de N microbiano en rumen aumentó linealmente en los bovinos ( $P = 0,02$ ) y disminuyó linealmente en los ovinos ( $P < 0,01$ ) con el incremento en los niveles de suplementación. La eficiencia de síntesis de proteína microbiana (ESPM) fue mayor para los bovinos que para los ovinos ( $P < 0,01$ , Cuadro 6) y disminuyó de manera similar en ambas especies a medida que se incrementó el nivel de suplementación.

### **8.1.2. Discusión:**

Teniendo en cuenta que los bovinos y ovinos utilizados en este experimento difirieron en sexo y grado de madurez, este trabajo demuestra importantes diferencias entre ambas especies en respuesta al incremento en los niveles de suplementación, cuando se manejan en sistemas de alimentación en base a pasturas templadas. El consumo similar (expresado como g/kg de PV<sup>0,75</sup>) registrado en ambos grupos de animales no suplementados es consistente con la estrecha relación que hay entre el peso metabólico y los requerimientos de los animales (Van Soest, 1994; Forbes, 2007). Sin embargo, con menores niveles de consumo de grano en relación a al peso metabólico en los ovinos que en los bovinos, el impacto de la suplementación sobre el consumo total de alimento fue diferente entre especies. Esta respuesta diferencial fue consecuencia de un impacto diferente de la suplementación en el consumo de forraje, evidenciado por un una mayor tasa de sustitución en los ovinos que en los bovinos. En efecto, la suplementación en los bovinos determinó una sustitución con adición, mientras que en los ovinos determinó una depresión en el consumo total de alimento. En ambas especies, el consumo de forraje se afectó negativamente por la suplementación con sorgo. Sin embargo, el máximo nivel de suplementación (tratamiento S15) determinó que los bovinos suplementados consumieran un 77% de la MO de forraje consumida por los bovinos sin suplementar, mientras que en los ovinos, el máximo nivel de suplementación determinó que los animales consumieran sólo un 46% del forraje consumido por los animales sin suplementar. El consumo de FND de forraje se relaciona con la

distensión del retículo-rumen, y ha sido considerado como el principal factor que limita el consumo en rumiantes consumiendo dietas basadas en forraje (Van Soest, 1994; Forbes, 2007). En nuestro trabajo, el diferente impacto de la suplementación sobre el consumo y la digestibilidad de la fibra podrían explicar las diferencias encontradas en el consumo total de MS y MO entre las especies. Los bovinos, tuvieron similar consumo total (forraje + concentrado) y digestibilidad de FND en todos los tratamientos; sin embargo el consumo de FND de forraje disminuyó con el incremento en el nivel de suplementación. Es así que, independientemente de la fuente (forraje o concentrado), el consumo total de FND, y no el de forraje, parece haber sido el factor principal que reguló el consumo en esta especie. En contraste, en los ovinos, la suplementación disminuyó el consumo total de fibra, lo que asociado a la caída lineal en el pH ruminal y en la digestibilidad de la FAD, podrían indicar una alteración digestiva que explicaría la disminución más pronunciada en el consumo de forraje y la caída en el consumo total de MS y MO en esta especie.

El incremento en la digestibilidad de la MO con la inclusión del grano de sorgo puede ser explicado por el hecho que el grano de sorgo es más digestible que la pastura. Sin embargo, el efecto del incremento en el nivel de suplementación sobre la digestibilidad de la fibra (afectada negativamente en ovinos y no afectada en bovinos) y del almidón (no afectada en ovinos y disminuida en bovinos) difiere de lo reportado por otros autores. De acuerdo con Colucci et al. (1989), a altos niveles de consumo, el incremento en la proporción de grano en la dieta lleva a un incremento en la digestibilidad de la MO mayor en los ovinos que en los bovinos. Esto se debe a una mayor digestibilidad de la FND y del almidón por parte de los ovinos. Südekum et al. (1995), comparando la capacidad de digestión de bovinos y ovinos consumiendo ensilaje de trigo cosechado en diferentes estados fenológicos de la planta, reportan una menor digestibilidad de la FND y FAD en ovinos que en bovinos, pero el incremento en el contenido de almidón (consecuencia del avance en el estado fenológico de la planta) afectó la digestión de la fibra de manera similar en ambas especies. Una diferencia importante entre nuestro estudio con los mencionados anteriormente es la manera en que se ofreció el grano. Se ha reportado que animales consumiendo dietas totalmente mezcladas presentan patrones de pH ruminal con menores variaciones que los animales consumiendo pasturas y suplementados con granos (Bargo et al. 2002b). En este sentido, Colucci et al (1989) y Südekum et al. (1995) ofrecieron el almidón y el forraje en simultáneo, mientras que en nuestro trabajo se suministraron separados. La mayor digestibilidad del almidón, en combinación con el menor pH ruminal y la menor relación acetato/propionato, en los ovinos respecto a los bovinos evidencia una mayor proporción del almidón fermentado en el rumen de los ovinos. Esta fermentación podría inhibir el crecimiento y la actividad de la flora celulolítica (Hoover, 1986; Cerrato-Sánchez et al. 2007) y podría explicar la menor digestión de la fibra en esta especie. Es así que, de acuerdo con estos resultados, parecería ser que los ovinos son más susceptibles que los bovinos a los efectos negativos de la suplementación con granos cuando éstos se suministran separados del forraje. La respuesta diferencial en digestibilidad del almidón entre especies, sumado al ambiente ruminal más estable observado en los bovinos, podría indicar que la tasa de pasaje de la digesta fue mayor en los bovinos que en los ovinos, lo cual es coincidente con reportes de estudios previos que compararon la cinética de pasaje del alimento entre bovinos y ovinos (Colucci et al. 1990).

Cuando el N a nivel ruminal no es limitante, la síntesis de proteína microbiana esta en relación al consumo de MO y la MO fermentada en rumen (Clark

et al. 1992; Bach et al. 2005). En este trabajo, en cada especie la síntesis de proteína microbiana siguió la misma tendencia que el consumo de MO, aumentó en bovinos y disminuyó en ovinos ( $r = 0,49$ ,  $P = 0,03$  para bovinos y  $r = 0,63$ ,  $P < 0,01$  para ovinos). Este patrón de respuesta puede explicar las diferencias observadas dentro de cada especie y entre ambas especies. Dado que, una mayor eficiencia de síntesis de proteína microbiana podría ser esperada a mayor tasa de pasaje de la digesta (Bach et al. 2005), la mayor ESPM en bovinos respecto a los ovinos podría ser consecuencia de una mayor tasa de pasaje en los primeros respecto a los segundos. Sin embargo, dado que la síntesis de proteína microbiana fue estimada usando ecuaciones diferentes para cada especie (Chen & Gomes, 1992), estas diferencias deben ser tomadas con cautela al analizar los resultados. La disminución en la ESPM por el incremento en los niveles de inclusión de grano de sorgo en la dieta de ambas especies fue inesperada. Resultados previos obtenidos por nuestro equipo de investigación en ovinos (Amaral, et al. 2011; Tebot et al. 2012) y reportados por Elizalde et al. (1999b) en bovinos, indican que la adición de concentrados almidonosos en la dieta de animales consumiendo pasturas templadas no mejora la ESPM, probablemente porque la ESPM de los animales consumiendo este tipo de pasturas como único alimento es muy elevada. De acuerdo con valores establecidos por Cheng et al. (2009), el grano de sorgo usado en este trabajo tenía niveles medios de taninos. Dado que los taninos del sorgo pueden tener efecto en la degradación del alimento y/o en la membrana de los microorganismos ruminales (Reed, 1995), estos elementos pueden estar envueltos en la caída de la ESPM por efecto de la suplementación. A su vez, alteraciones en el tránsito digestivo o en el nivel de algún micronutriente (ej. Azufre o ácidos grasos ramificados) como consecuencia de la inclusión del grano en la dieta podrían ser factores envueltos este resultado.

## **8.2. EXPERIMENTO II:**

### **8.2.1. Resultados:**

#### Ensayo con bovinos:

Los bovinos suplementados presentaron una mayor concentración plasmática de glucosa y una menor concentración plasmática de glucagón que los no suplementados ( $P \leq 0,02$ ). A su vez, tendieron a tener una mayor concentración plasmática de insulina y una mayor relación insulina/glucagón ( $P = 0,08$ ) que los bovinos no suplementados (Cuadro 7, Figura 1a-d). Las concentraciones de glucosa e insulina y la relación insulina/glucagón no fueron afectadas por efecto de la hora o la interacción tratamiento por hora. Sin embargo, para el glucagón se detectó una interacción entre el tratamiento y la hora ( $P < 0,01$ ). A la hora 0, el glucagón plasmático fue menor en los bovinos suplementados que en los no suplementados ( $P < 0,01$ ), sin embargo en los animales suplementados la concentración de glucagón aumentó en las primeras 2 horas luego del inicio de la ingesta de alimento ( $P < 0,01$ ), mientras que en los no suplementados la concentración disminuyó a las 4 horas de iniciada la ingesta de alimento ( $P < 0,01$ ; Figura 1c). La concentración hepática de ARNm del *INSR* y de la *PC* no difirió entre tratamientos, sin embargo el ARNm de la *PCK1* fue menor en los bovinos suplementados que en los no suplementados ( $P = 0,02$ ; Cuadro 7).

La concentración plasmática de glucosa tendió a correlacionarse con el consumo de almidón digestible ( $r = 0,52$ ,  $P = 0,09$ ). La concentración de insulina se correlacionó con el consumo de MO digestible ( $r = 0,74$ ,  $P < 0,05$ ), con el consumo

de almidón digestible ( $r = 0,68$ ,  $P < 0,05$ ) y con la concentración plasmática de glucagón ( $r = 0,64$ ,  $P < 0,05$ ). La expresión del ARNm de la *PCK1* se correlacionó negativamente con la insulina plasmática ( $r = -0,92$ ,  $P < 0,05$ ). La concentración hepática del ARNm de la *PC* se correlacionó negativamente con la concentración de propionato en rumen ( $r = -0,97$ ,  $P < 0,05$ ).

**Cuadro 7:** Concentración plasmática de glucosa, insulina y glucagón y concentración hepática de ARNm del receptor de insulina (*INSR*), de la *piruvato carboxilasa* (*PC*) y de la *fosfoenolpiruvato carboxikinasa* (*PCK1*) en bovinos consumiendo una pastura templada fresca y suplementados o no con grano de sorgo molido

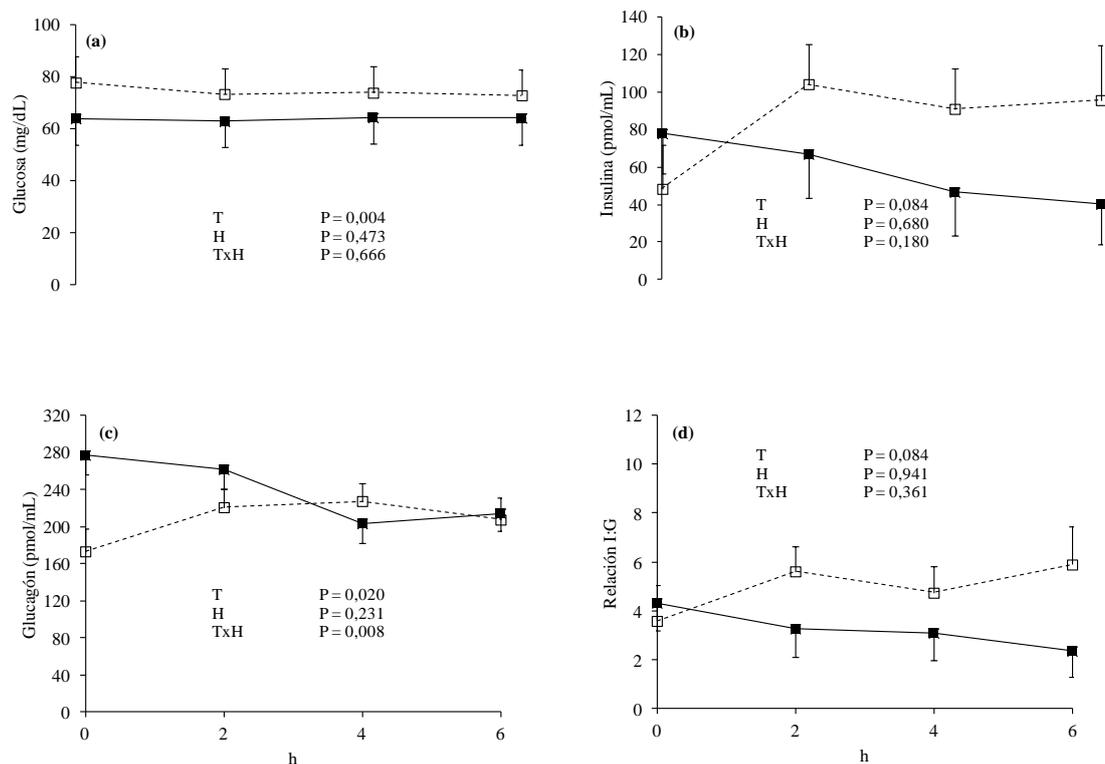
Item	Tratamientos <sup>a</sup>		EEM	P <sup>b</sup>		
	S0	S15		T	H	T x H
Concentraciones plasmáticas						
Glucosa (mg/dL)	63,5	74,3	9,89	0,004	0,473	0,666
Insulina (pmol/mL)	57,9	84,7	15,3	0,084	0,680	0,180
Glucagón (pmol/mL)	239	207	11,6	0,020	0,231	0,008
Relación insulina/glucagón	3,27	4,97	0,75	0,084	0,941	0,361
Concentración hepática de ARNm						
<i>INSR</i>	14,2	12,1	1,85	0,439		
<i>PC</i>	60,2	40,7	7,43	0,123		
<i>PCK1</i>	28,4	15,4	3,42	0,020		

<sup>a</sup> S0, no suplementado, S15, suplementado a razón de 15 g/kg PV

<sup>b</sup> nivel de significancia de los efectos tratamiento (T), hora (H) e interacción tratamiento por hora (T x H)

#### Ensayo con ovinos:

Las concentraciones plasmáticas de glucosa e insulina y la relación insulina/glucagón no difirió entre tratamientos (Cuadro 8, Figura 2 a-d). Sin embargo, los ovinos suplementados tendieron a tener mayores concentraciones de glucagón plasmático que los no suplementados ( $P = 0,053$ ). La insulina plasmática aumentó al doble ( $P \leq 0,03$ ) su concentración durante las primeras 2 o 4 horas luego del inicio de la ingesta en los ovinos no suplementados y suplementados, respectivamente, retornando en ambos grupos al nivel basal a la hora 6 (Figura 2b). Para las concentraciones plasmáticas de glucosa y glucagón no se detectó un efecto de la hora ni de la interacción entre el tratamiento y la hora. Sin embargo, para la relación insulina/glucagón se detectó un efecto de la hora y de la interacción tratamiento por hora (Cuadro 8, Figura 2d). Mientras que en los ovinos no suplementados la relación insulina/glucagón aumentó al doble entre la hora 0 y 2 ( $P < 0,01$ ) y luego se mantuvo constante, en los animales suplementados la relación insulina/glucagón tendió a aumentar entre la hora 0 y 2 ( $P = 0,10$ ), aumentó cuatro veces a la hora 4 ( $P < 0,01$ ) para volver a las concentraciones basales a la hora 6 (Figura 2d). La concentración hepática de ARNm del *INSR* y de la *PC* no difirió entre tratamientos, sin embargo el ARNm de la *PCK1* fue menor en los ovinos suplementados que en los no suplementados ( $P = 0,048$ ; Cuadro 8). La concentración hepática del ARNm de la *PC* y de la *PCK1* tendieron a correlacionarse negativamente entre sí ( $r = -0,64$ ,  $P = 0,06$ ).



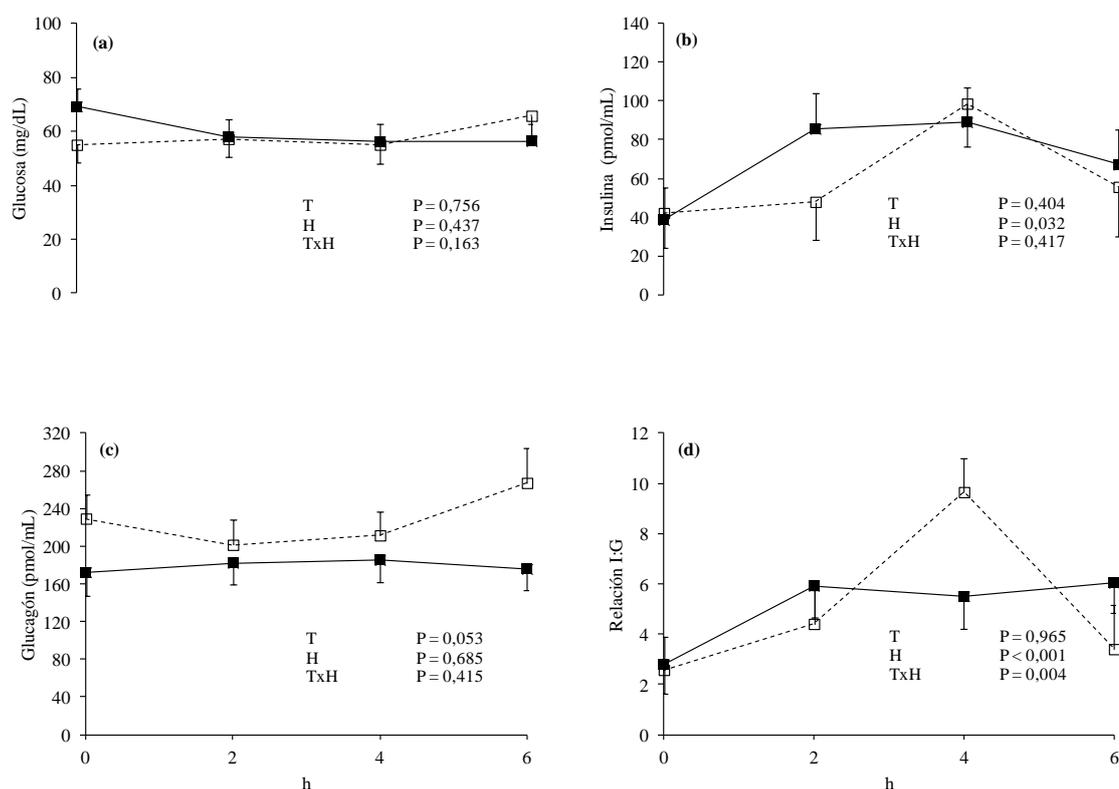
**Figura 1:** Dinámica de la concentración plasmática de glucosa (A), insulina (B), glucagón (C) y relación insulina/glucagón (D) en bovinos consumiendo una pastura templada fresca como único alimento (línea continua) o suplementados con grano de sorgo molido a razón de 15 g/kg de su PV (línea punteada). La hora 0 representa el inicio de la ingesta de alimento y el momento de la suplementación. T, tratamiento; H, hora (medias  $\pm$  EEM; n = 6).

**Cuadro 8:** Concentración plasmática de glucosa, insulina y glucagón y concentración hepática de ARNm del receptor de insulina (*INSR*), de la *piruvato carboxilasa* (*PC*) y de la *fosfoenolpiruvato carboxikinasa* (*PCK1*) en ovinos consumiendo una pastura templada fresca y suplementados o no con grano de sorgo molido

Item	Tratamientos <sup>a</sup>			EEM	P <sup>b</sup>		
	S0	S15			T	H	T x H
Concentraciones plasmáticas							
Glucosa (mg/dL)	60,0	58,3	5,61	0,756	0,437	0,163	
Insulina (pmol/mL)	70,2	61,1	14,2	0,404	0,032	0,417	
Glucagón (pmol/mL)	179	227	18,8	0,053	0,685	0,415	
Relación insulina/glucagón	5,07	5,02	1,07	0,965	<0,001	0,004	
Concentración hepática de ARNm							
<i>INSR</i>	11,3	12,8	2,23	0,663			
<i>PC</i>	38,9	35,9	7,82	0,758			
<i>PCK1</i>	11,2	8,60	2,66	0,048			

<sup>a</sup> S0, no suplementado, S15, suplementada a razón de 15 g/kg PV

<sup>b</sup> nivel de significancia de los efectos tratamiento (T), hora (H) e interacción tratamiento por hora (T x H)



**Figura 2:** Dinámica de la concentración plasmática de glucosa (A), insulina (B), glucagón (C) y relación insulina/glucagón (D) en ovinos consumiendo una pastura templada fresca como único alimento (línea continua) o suplementados con grano de sorgo molido a razón de 15 g/kg de su PV (línea punteada). La hora 0 representa el inicio de la ingesta de alimento y el momento de la suplementación. T, tratamiento; H, hora (medias  $\pm$  EEM; n = 6).

### 8.2.2. Discusión:

Considerando que los bovinos y ovinos utilizados en este experimento difirieron en sexo, grado de madurez y balance energético, el presente trabajo reporta los mecanismos de adaptación en el metabolismo de la glucosa cuando rumiantes, en balance energético positivo, consumiendo una pastura templada son suplementados con grano de sorgo. De acuerdo con Aschenbach et al (2010), la mayor concentración plasmática de glucosa en los bovinos suplementados respecto a los sin suplementar puede ser explicado por una mayor absorción de glucosa en el intestino delgado y/o por una mayor neoglucogénesis a nivel hepática o renal. Como se reportó en el *Experimento I*, los bovinos suplementados tuvieron mayor consumo de almidón que los no suplementados ( $9,52$  vs.  $0,87 \pm 0,08$  g/kg PV,  $P < 0,05$ ). Dado que, de acuerdo a los resultados obtenidos en el *Experimento III* y a datos reportados en la bibliografía internacional (Offner et al. 2003) el almidón del grano de sorgo tiene una degradabilidad en rumen del entorno al 65%, la suplementación con este grano proporciona una mayor oferta de almidón a intestino delgado (almidón de pasaje), que tras su digestión permitiría aumentar la absorción intestinal de glucosa. Cuanto mayor es la cantidad de almidón que entra a intestino delgado, mayor es la cantidad de almidón que se digiere en este sector del tubo digestivo (Huntington et al. 2006). Sin embargo, en rumiantes la importancia de la glucosa absorbida desde el intestino delgado en la oferta total de glucosa para los tejidos periféricos es relativa (Reynolds et al. 2003; Doepel et al. 2009). En este estudio, la concentración plasmática de glucosa y el consumo de almidón digestible tuvieron

una correlación baja, indicando que la glucosa absorbida desde el intestino delgado, como único factor, no explicaría la mayor concentración plasmática de glucosa en los bovinos suplementados respecto a lo sin suplementar

Los rumiantes tienen una gran dependencia de la neoglucogénesis para cubrir sus requerimientos de glucosa, siendo el hígado el sitio predominante para su síntesis (Huntington et al. 2006; Aschenbach et al. 2010). El propionato, derivado de la fermentación ruminal de los alimentos, es el precursor de mayor importancia para la síntesis de glucosa en los rumiantes, representando un importante vínculo entre el consumo de energía y la producción de glucosa a nivel hepático (Reynolds et al. 1994, 2003; Huntington et al. 2006). En nuestro trabajo, los bovinos suplementados tuvieron mayor concentración en rumen de AGV totales (102 vs. 71,0 mmol/L, suplementados vs. no suplementados respectivamente) y de propionato (16,5 vs. 10,9 mmol/L, suplementados vs. no suplementados respectivamente) (*Experimento I*). Dado que, la tasa de conversión de propionato a glucosa en animales consumiendo dietas ricas en concentrados es mayor que en aquellos consumiendo dietas altas en forraje (Drackley et al. 2001) y que el consumo de energía está directamente relacionado con la tasa de neoglucogénesis hepática y con la cantidad de propionato que se convierte en glucosa (Huntington et al. 2006), un mayor consumo de energía (157% vs. 74% sobre los requerimientos de mantenimiento) y una mayor concentración ruminal de AGV totales y de propionato podrían explicar la mayor concentración plasmática de glucosa en los bovinos suplementados.

De acuerdo con resultados previos, la concentración de insulina y glucagón plasmática es más alta durante las primeras 4 horas luego de la alimentación (Brockman, 1978). Estas hormonas han demostrado respuestas a la hiperglucemia y a la hipoglucemia, respectivamente. Sin embargo, en nuestro trabajo sus concentraciones no estuvieron correlacionadas con la glucosa plasmática. La correlación de la insulina con el consumo de MO y de almidón digestible, indicaría que un mayor consumo de energía podría aportar un suministro mayor de precursores neoglucogénicos y de factores insulíntrópicos (Brockman, 1978; Harmon, 1992). Los AGV, particularmente el propionato (y el butirato) son potentes estimuladores de la secreción de insulina y glucagón (Harmon, 1992). En efecto, la concentración ruminal de AGV y de propionato así como la concentración de glucosa e insulina fueron o tendieron a ser mayores en los bovinos suplementados respecto a los no suplementados. En contraste, el glucagón plasmático fue menor en los bovinos suplementados debido a su menor concentración antes del inicio de la comida (hora 0). Aunque la secreción de glucagón se relaciona con el consumo de energía, la composición de la dieta puede tener influencia en su secreción ya que se ha reportado que la concentración plasmática de glucagón fue menor en bovinos consumiendo dietas altas en concentrado que en bovinos consumiendo dietas ricas en forrajes (Harmon, 1992).

De manera similar a lo reportado en trabajos previos (Astessiano et al. 2013), la suplementación con sorgo no afectó la concentración del *INSR* en hígado, lo que sugeriría, que al menos en este aspecto, la sensibilidad hepática a la insulina no fue modificada por la suplementación. En este sentido, se ha indicado que en rumiantes la insulina tiene mayor efecto en la captación de glucosa por parte de los tejidos no hepáticos que a nivel de hígado (Brockman, 1978). El suministro de precursores glucogénicos al hígado (ej. Propionato, aminoácidos glucogénicos) es la que regula en mayor medida la síntesis de glucosa. Una expresión y actividad diferencial de las enzimas *PC* y *PCK1*, entre otras enzimas, puede regular la tasa de entrada de estos

precursores para la síntesis de glucosa en el hígado de los bovinos (Aschenbach et al. 2010). Según resultados obtenidos en vacas lecheras en inicio de lactación, la expresión del ARNm de la *PCK1* aumenta a medida que el consumo de MS (Greenfield et al. 2000) y la concentración de propionato en rumen (Karcher et al. 2007) se incrementan. Sin embargo, en nuestro trabajo aunque los bovinos suplementados tuvieron mayor consumo y mayores concentraciones de propionato en rumen y de glucosa en plasma, el ARNm de la *PCK1* en hígado disminuyó respecto a los animales no suplementados. En acuerdo con la correlación negativa encontrada entre la concentración plasmática de insulina y la concentración de ARNm de la *PCK1*, otros autores observaron una disminución en la expresión de este transcrito en vacas lecheras con mayores concentraciones de glucosa e insulina y menores concentraciones de glucagón en plasma (She et al. 1999; Bobe et al. 2009). Por otro lado, mientras que en nuestro trabajo no se detectó efecto de la suplementación en la concentración de ARNm de la *PC* a nivel de hígado, se ha reportado que la expresión de la *PC* aumenta en vacas lecheras en lactación temprana asociada a una menor relación insulina/glucagón (Greenfield et al. 2000; Bobe et al. 2009). Estos resultados contrastantes en la expresión del ARNm de la *PCK1* y de la *PC* en el hígado puede ser resultado del modelo animal utilizado (vacas lecheras vs. vaquillonas de carne), del balance energético de los animales (negativo vs. positivo) y de la función fisiológica (producción de leche vs. crecimiento). Así, la mayor concentración del ARNm de la *PCK1* en los bovinos no suplementados y la correlación negativa entre la concentración de propionato en rumen y el ARNm de la *PC* podría indicar un mecanismo de adaptación por el cual vaquillonas en crecimiento (en balance energético positivo) consumiendo dietas altas en forraje incrementan el uso del propionato absorbido para la producción de glucosa.

Finalmente, la mayor concentración de glucosa e insulina en plasma y la menor concentración plasmática de glucagón y de ARNm de la *PCK1* a nivel de hígado, podrían indicar un mayor anabolismo en los bovinos suplementados en comparación con los no suplementados. Estos resultados estuvieron asociados a un mayor consumo y digestibilidad de la MO, mayor concentración de AGV totales y de propionato en rumen (*Experimento I*) y una mayor retención de nitrógeno en los animales suplementados respecto a los no suplementados, lo que sugiere que la suplementación resulta en una mayor respuesta productiva de bovinos consumiendo pasturas.

En los ovinos, la respuesta endocrino-metabólica a la suplementación con grano de sorgo no fue tan clara como en los bovinos, ya que la suplementación no afectó la concentración plasmática de glucosa e insulina, ni la relación insulina/glucagón. Como se reportó en los resultados del *Experimento I*, la suplementación en los ovinos resultó en una mayor fermentación a nivel ruminal, con caídas en los niveles de pH que llevaron a una caída en la digestibilidad de la fibra y en el consumo total de MO. El consumo de MO cayó desde 1780 a  $1445 \pm 111$  g/día y el pH disminuyó de 6,45 a  $5,52 \pm 0,15$  con la suplementación en esta especie. Sin embargo al mismo tiempo la suplementación aumentó la digestibilidad de la MO desde 0,70 a  $0,78 \pm 0,01$ , con lo cual el consumo de MO digestible no varió entre los grupos. A pesar del consumo similar de MO digestible entre los ovinos suplementados y los no suplementados, la composición química de la dieta varió entre grupos. Aunque el mayor consumo de almidón tendió a incrementar la concentración de AGV totales y de propionato, la suplementación no afectó la concentración de glucosa e insulina, y llevó a un aumento no esperado en la

concertación plasmática de glucagón. Esta respuesta contrastante en los ovinos, puede estar asociada a una menor tasa de absorción de AGV, que llevaría al acumulo de AGV en el rumen de los ovinos suplementados sin afectar la concentración de glucosa o insulina en plasma. En efecto, López et al. (2003) reportan una acumulación de AGV (reducción del pH) cuando se dan grandes ingestas de carbohidratos rápidamente fermentables en rumen. A su vez, el mayor incremento en la relación insulina/glucagón en el plasma de los ovinos suplementados podría determinar una mayor entrada de glucosa del plasma a los tejidos en este grupo de animales. Estos cambios podrían explicar, al menos parcialmente, las diferencias en la respuesta endocrino-metabólicas observadas entre especies como consecuencia de la suplementación.

Aunque la suplementación no afectó los perfiles plasmáticos de glucosa e insulina en los ovinos, los cambios en la concentración hepática del ARNm siguieron los mismos patrones que en los bovinos, no se afectó la concentración del ARNm del *INSR* y de la *PC* y disminuyó la de *PCK1* como consecuencia de la suplementación. Con lo cual parecería que la suplementación con grano de sorgo tanto en bovinos como en ovinos, en balance energético positivo, consumiendo pasturas templadas, modifica el metabolismo hepático para priorizar el uso de propionato como precursor neoglucogénico.

### **8.3. EXPERIMENTO III:**

#### **8.3.1. Resultados:**

El contenido final de MS en las muestras reconstituidas (G, G&E, E.ge o E.gm) fue aproximadamente un 22% inferior que las muestras de grano seco ( $P < 0,05$ , Cuadro 9). El tratamiento remojado resultó en los menores niveles de MS de todos los tratamientos evaluados ( $P < 0,05$ , Cuadro 9). El contenido de MO no difirió entre los tratamientos seco, remojado, o ensilado con el grano entero, sin embargo los tratamientos germinado, germinado y ensilado, y ensilado con el grano molido determinaron una menor concentración de MO respecto al grano seco ( $P < 0,05$ ). La concentración de almidón no varió entre los tratamientos control (seco), ensilado con el grano molido, o germinado, sin embargo el tratamiento remojado y el ensilado con el grano entero determinaron una disminución del 14% y el tratamiento germinado y ensilado una disminución del 25% en el contenido de almidón ( $P < 0,05$ ). Los granos germinados (tratamiento G) tuvieron mayor contenido de nitrógeno que los granos secos ( $P < 0,05$ ), pero no se detectaron diferencias entre los otros tratamientos y el control para esta variable. La concentración de FND tendió a ser afectada por los tratamientos ( $P = 0,09$ ), sin embargo la concentración de FAD no difirió entre tratamientos. Los tratamientos que incluyeron la reconstitución y ensilado de los granos (tanto enteros como molidos) resultaron efectivos en disminuir la concentración de taninos condensados ( $P < 0,05$ ). Los tratamientos germinado y ensilado, y ensilado con el grano entero tuvieron menores valores de pH que el tratamiento ensilado con el grano molido ( $P < 0,05$ ).

El sitio de digestión y la digestibilidad total de la MS fue similar entre los tratamientos seco, germinado, y ensilado con el grano entero (Cuadro 10). Sin embargo, comparado con estos tratamientos, los tratamientos germinado y ensilado, y ensilado con el grano molido fueron efectivos en incrementar la degradabilidad ruminal y la digestibilidad total de la MS ( $P < 0,05$ ). La digestibilidad total de la MS

no varió entre el tratamiento remojado y el grano seco, sin embargo el remojado disminuyó la degradabilidad ruminal y aumentó la digestibilidad intestinal respecto al grano seco ( $P < 0,05$ , Cuadro 10). El sitio de digestión y la digestibilidad total del almidón fue similar entre el tratamiento control y el ensilado con el grano molido. Aunque, los tratamientos germinado y ensilado y ensilado con el grano entero tuvieron similar digestibilidad total del almidón que el grano seco, estos tratamientos redujeron la degradabilidad ruminal y aumentaron la digestibilidad intestinal del almidón comparado con el control ( $P < 0,05$ ). Los grano remojados y los germinados tuvieron menor degradabilidad ruminal y digestibilidad total del almidón que los granos secos ( $P < 0,05$ ).

**Cuadro 9:** Composición química<sup>f</sup> de granos de sorgo: secos (control), remojados por 24 horas (Rem), reconstituidos hasta 300 g/kg de humedad y luego germinados por 5 días (G), germinados por 5 días y ensilados por 21 días (G&E), ensilados por 21 días con el grano entero (E.ge), o ensilados por 21 días con el grano previamente molido (E.gm)

item	Seco	Rem	G	G&E	E.ge	E.gm	EEM <sup>g</sup>	P <sup>h</sup>
MS, (g/kg)	896 <sup>a</sup>	633 <sup>d</sup>	732 <sup>b</sup>	688 <sup>c</sup>	694 <sup>c</sup>	689 <sup>c</sup>	4,1	<0,01
Composición, (g/kg MS)								
MO	986 <sup>a</sup>	986 <sup>a</sup>	985 <sup>bc</sup>	985 <sup>bc</sup>	985 <sup>ab</sup>	984 <sup>c</sup>	0,7	<0,01
Almidón	705 <sup>a</sup>	619 <sup>b</sup>	638 <sup>ab</sup>	530 <sup>c</sup>	613 <sup>b</sup>	673 <sup>ab</sup>	17,0	<0,01
N total	13,4 <sup>bc</sup>	13,0 <sup>c</sup>	14,5 <sup>a</sup>	13,6 <sup>bc</sup>	13,1 <sup>c</sup>	14,0 <sup>ab</sup>	0,29	<0,01
FND	119	105	120	92,7	133	102	13,1	0,09
FAD	42,5	40,5	41,0	40,0	42,6	43,4	7,08	0,73
TC	6,80 <sup>a</sup>	4,16 <sup>ab</sup>	8,42 <sup>a</sup>	4,76 <sup>ab</sup>	1,76 <sup>b</sup>	0,94 <sup>b</sup>	1,971	<0,01
pH	--	--	--	4,49 <sup>b</sup>	4,49 <sup>b</sup>	5,33 <sup>a</sup>	0,110	<0,01

<sup>f</sup> MS, material seca; MO, material orgánica; N total, nitrógeno total; FND, fibra neutro detergente; FAD, fibra ácido detergente; TC, taninos condensados.

<sup>g</sup> error estándar de la media ( $n = 5$ ).

<sup>h</sup> Nivel de significancia del efecto tratamiento. Diferentes letras en la misma fila,  $P < 0,05$ .

**Cuadro 10:** Sitio de digestión y digestibilidad total<sup>a</sup> de granos de sorgo: secos (control), remojados por 24 horas (Rem), reconstituidos hasta 300 g/kg de humedad y luego germinados por 5 días (G), germinados por 5 días y ensilados por 21 días (G&E), ensilados por 21 días con el grano entero (E.ge), o ensilados por 21 días con el grano previamente molido (E.gm)

item	Seco	Rem	G	G&E	E.ge	E.gm	EEM <sup>g</sup>	P <sup>h</sup>
Materia Seca								
DR	0,650 <sup>cd</sup>	0,589 <sup>e</sup>	0,620 <sup>d</sup>	0,715 <sup>a</sup>	0,658 <sup>c</sup>	0,687 <sup>b</sup>	0,0190	<0,01
DI	0,201 <sup>bc</sup>	0,253 <sup>a</sup>	0,236 <sup>ab</sup>	0,175 <sup>c</sup>	0,206 <sup>b</sup>	0,197 <sup>c</sup>	0,0166	<0,01
DT	0,850 <sup>bc</sup>	0,843 <sup>c</sup>	0,856 <sup>bc</sup>	0,891 <sup>a</sup>	0,864 <sup>b</sup>	0,884 <sup>a</sup>	0,0068	<0,01
Almidón								
DR	0,658 <sup>a</sup>	0,517 <sup>d</sup>	0,548 <sup>c</sup>	0,605 <sup>b</sup>	0,582 <sup>b</sup>	0,676 <sup>a</sup>	0,0251	<0,01
DI	0,246 <sup>c</sup>	0,340 <sup>a</sup>	0,325 <sup>ab</sup>	0,305 <sup>b</sup>	0,297 <sup>b</sup>	0,248 <sup>c</sup>	0,0209	<0,01
DT	0,902 <sup>ab</sup>	0,857 <sup>d</sup>	0,872 <sup>cd</sup>	0,907 <sup>a</sup>	0,880 <sup>bc</sup>	0,925 <sup>a</sup>	0,0075	<0,01

<sup>f</sup> DR, degradabilidad ruminal a las 16 horas de incubación en rumen; DI, digestibilidad intestinal; DT, digestibilidad total (calculada como la suma de DR y DI).

<sup>g</sup> error estándar de la media ( $n = 15$ ).

<sup>h</sup> Nivel de significancia del efecto tratamiento. Diferentes letras en la misma fila,  $P < 0,05$ .

Los parámetros de la producción de gas *in vitro* fueron similares entre el control, el tratamiento remojado, y el ensilado con el grano entero, sin embargo, el tiempo al cual ocurrió la tasa máxima de fermentación fue mayor para el remojado

que para el grano seco ( $P < 0,05$ , Cuadro 11). El tiempo en que se produjo la mitad del gas asintótico, la tasa máxima de fermentación y el tiempo al cual ocurrió la tasa máxima de fermentación fueron similares entre el tratamiento germinado y el grano seco. Sin embargo, la producción de gas asintótica fue menor para los germinados que para el seco ( $P < 0,05$ ). Aunque, la producción de gas asintótica fue menor para los tratamientos germinado y ensilado y ensilado con el grano molido comparado al grano seco, estos tratamientos disminuyeron el tiempo en que se produjo la mitad del gas asintótico sin afectar el tiempo al cual ocurrió la tasa máxima de fermentación. La mayor tasa máxima de fermentación se obtuvo el tratamiento germinado y ensilado ( $P < 0,05$ ).

**Cuadro 11:** Parámetros de producción de gas *in vitro*<sup>f</sup> de granos de sorgo: secos (control), remojados por 24 horas (Rem), reconstituidos hasta 300 g/kg de humedad y luego germinados por 5 días (G), germinados por 5 días y ensilados por 21 días (G&E), ensilados por 21 días con el grano entero (E.ge), o ensilados por 21 días con el grano previamente molido (E.gm)

item	Seco	Rem	G	G&E	E.ge	E.gm	EEM <sup>g</sup>	P <sup>h</sup>
A (mL/g)	285 <sup>ab</sup>	292 <sup>a</sup>	271 <sup>c</sup>	266 <sup>c</sup>	283 <sup>b</sup>	265 <sup>c</sup>	13,5	<0,01
C (h)	10,0 <sup>ab</sup>	10,6 <sup>a</sup>	9,91 <sup>b</sup>	8,67 <sup>c</sup>	9,58 <sup>b</sup>	8,93 <sup>c</sup>	0,528	<0,01
R <sub>max</sub> (mL/h)	18,1 <sup>bcd</sup>	17,9 <sup>cd</sup>	17,5 <sup>d</sup>	19,8 <sup>a</sup>	18,9 <sup>abc</sup>	19,4 <sup>ab</sup>	1,57	<0,01
T <sub>max</sub> (h)	4,68 <sup>bc</sup>	5,66 <sup>a</sup>	4,81 <sup>bc</sup>	4,56 <sup>c</sup>	5,04 <sup>b</sup>	4,96 <sup>bc</sup>	0,863	<0,01

<sup>f</sup> A, producción de gas asintótica; C, tiempo en el cual la mitad del gas asintótico se produce; R<sub>max</sub>, tasa máxima de fermentación; T<sub>max</sub>, tiempo al cual ocurre R<sub>max</sub>.

<sup>g</sup> error estándar de la media (n = 15).

<sup>h</sup> Nivel de significancia del efecto tratamiento. Diferentes letras en la misma fila,  $P < 0,05$ .

### 8.3.2. Discusión:

Este estudio demuestra diferentes efectos sobre la composición química, sitio de digestión y la dinámica de la fermentación *in vitro* de la adición de agua *per se*, del proceso de germinación, del proceso de ensilaje o de su asociación en granos de sorgo reconstituidos. Aunque no se detectaron pérdidas significativas de materia seca como consecuencia de los tratamientos se debe considerar que los tratamientos fueron desarrollados en condiciones de laboratorio y no en condiciones de campo.

Aunque de pequeña magnitud, la disminución en el contenido de MO en los tratamientos germinado, germinado y ensilado, y ensilado con el grano molido indican que la activación de procesos biológicos relacionados a la germinación o el ensilaje llevan a un consumo de MO como fue reportado por Pflugfelder et al. (1986). El hecho que, en los granos germinados y ensilados y en los ensilados con el grano entero la disminución en la concentración de almidón haya sido de mayor magnitud que la disminución en la concentración de MO, podría indicar una degradación del almidón a carbohidratos más simples como consecuencia de estos tratamientos. De manera similar a nuestros resultados, otros autores reportan una disminución en la concentración de almidón en granos de sorgo germinados y ensilados. Por ejemplo, Pflugfelder et al. (1986) y Balogun et al. (2005) comunican una disminución en la concentración de almidón acompañado de un incremento en la concentración de azúcares libres y de nitrógeno soluble. Según estos autores, ésto fue consecuencia de la activación de enzimas endógenas durante la germinación del grano que degradan la estructura de la matriz proteica exponiendo los gránulos de almidón para ser hidrolizados. En nuestro trabajo el proceso de germinación, como único factor, no produjo una caída significativa en el contenido de almidón de los

granos de sorgo, pero cuando el proceso de germinación se combinó con el proceso de ensilaje, la caída en la concentración de almidón fue detectada. Debido a que el oxígeno disuelto en el agua adicionada o atrapado entre los granos de sorgo puede inducir el crecimiento vegetativo durante las etapas tempranas de la reconstitución (Pflugfelder et al. 1986), un período corto de germinación (no intencional) en combinación con el proceso de ensilaje pudo determinar la disminución en el contenido de almidón en el tratamiento ensilado con el grano entero. Por otro lado, la molienda del grano antes de la reconstitución y ensilado en el tratamiento ensilado con el grano molido impide la germinación en el grano. Esto explicaría la mayor concentración de almidón (menor hidrólisis de almidón) y el mayor pH (menor concentración de azúcares libres como sustrato para la fermentación de microorganismos) en este tratamiento en comparación con los tratamientos germinado y ensilado, o ensilado con el grano entero. La menor concentración de almidón en el tratamiento remojado respecto al grano seco fue inesperada ya que otros autores no encontraron diferencias en la concentración de almidón entre granos de sorgo remojados y secos (Pflugfelder et al., 1986, Balogun et al., 2005). Esta caída probablemente no fue asociada con una hidrólisis de almidón como consecuencia del tratamiento. En este sentido, la disminución en la degradabilidad ruminal de la MS y el retardo en el tiempo al cual se dió la tasa máxima de fermentación *in vitro* ( $T_{max}$ ), en el tratamiento remojado respecto al grano seco, indicarían una menor concentración de elementos de rápida degradación resultantes de la hidrólisis de almidón en este tratamiento.

Como factores únicos, los procesos de germinación o de ensilaje no afectaron el sitio de digestión ni la digestibilidad total de los granos de sorgo tratados enteros, ya que no se encontraron diferencias entre los tratamientos germinado, o ensilado con el grano entero y los granos secos para estas variables. Sin embargo, cuando estos procesos se combinaron (tratamiento G&E) fueron efectivos en incrementar la degradabilidad ruminal y la digestibilidad total de la MS. Ésto sugiere un efecto sinérgico entre el proceso de germinación y el de ensilaje en orden mejorar la digestibilidad ruminal y total de la MS en el grano de sorgo, resultados que están de acuerdo con los reportados por Pflugfelder et al. (1986). Estos autores señalan que períodos cortos de germinación previos al almacenamiento anaerobio del grano, acelera la fermentación bacteriana lo que repercute en mejoras en la digestibilidad del grano de sorgo en rumiantes. Por otro lado, la molienda del grano antes de la reconstitución (tratamiento E.gm), que expone el endospermo al proceso de ensilaje, también resultó efectiva para incrementar la degradación ruminal y la digestibilidad total de la MS respecto al grano seco. Este resultado puede ser atribuido al efecto del ensilaje en reducir el contenido de taninos condensados en el grano de sorgo. En este sentido, Torterolo et al. (2012) evaluando el efecto del ensilaje en la composición química y el sitio de digestión de granos de sorgo cosechados húmedos, reportaron una disminución en el contenido de taninos condensados y un incremento en la degradación ruminal de la MS por efecto del ensilado. Este mismo efecto podría explicar también la mayor degradabilidad de la MS y del almidón del tratamiento ensilado con el grano entero respecto al germinado.

La menor degradación ruminal del almidón en los tratamientos germinado, germinado y ensilado, y ensilado con el grano entero respecto al control, podría estar asociado al proceso intencional (tratamientos G y G&E) o no intencional (tratamiento E.ge) de germinación desarrollado en estos tratamientos. Probablemente la fracción del almidón de más fácil fermentación, sea la que haya sido hidrolizada a carbohidratos más simples durante el proceso de germinación.

Ésto llevaría al incremento en la concentración del almidón más resistente a la fermentación en estos tratamientos, y consecuentemente a la disminución en la degradación ruminal. El hecho que el ensilado con el grano molido sea el único tratamiento capaz de incrementar la degradabilidad ruminal y la digestibilidad total de la MS sin afectar el sitio de digestión del almidón refuerza la idea de que el proceso de germinación podría determinar una disminución en la degradación del almidón. Balogun et al. (2005) reportaron que comparado con el grano seco, el remojado por 24 h redujo la cantidad de almidón fermentado y la producción total de ácidos grasos volátiles luego de 5 h de fermentación *in vitro* en líquido ruminal. En nuestro trabajo, la menor degradación ruminal de la MS, y la menor degradación ruminal y digestión total del almidón en los granos remojados están de acuerdo con los resultados de Balogun et al. (2005) y podrían asociarse al retardo en el tiempo en que ocurrió la tasa máxima de fermentación *in vitro* en este tratamiento. Un retraso en este parámetro podría determinar una disminución en la degradación ruminal, máxime si se considera que los granos fueron incubados por 16 h en rumen.

La dinámica de la producción de gas *in vitro* confirma el efecto sinérgico entre los procesos de germinación y ensilaje. El menor tiempo en que se produce la mitad del gas asintótico (C) y la mayor tasa de fermentación ( $R_{max}$ ) en el tratamiento germinado y ensilado comparado al germinado, o al ensilado con el grano molido, está de acuerdo con una mayor hidrólisis de almidón (mayor cantidad de azúcares libres) y con el incremento de la degradación ruminal y la digestibilidad total de la MS de los granos germinados y ensilados. Similar a nuestros resultados, Balagun et al. (2005) reportaron un efecto sinérgico de los procesos de germinación y ensilaje en la fermentación *in vitro* de granos de sorgo. Los granos germinados y ensilados tuvieron mayor fermentación del almidón, mayor producción total de gas y de AGV comparados con los granos germinados únicamente, o reconstituidos y ensilados (Balogun et al. 2005). Comparado con el grano seco, el menor tiempo en que se produce la mitad del gas asintótico en el tratamiento ensilado con el grano molido podría estar asociado con el incremento en la degradabilidad ruminal y la digestibilidad total en este tratamiento. Probablemente la exposición del endospermo del grano al proceso de ensilaje y el efecto que se encontró en el contenido de taninos condensados en este tratamiento estén envueltos en este resultado, ya que los taninos pueden tener efecto negativo sobre la degradación de los alimentos y/o en las membranas de los microorganismos ruminales (Reed, 1995).

## 9. CONCLUSIONES E IMPLICANCIAS

Con similar proporción de grano en la dieta, el incremento en los niveles de suplementación con grano de sorgo determinó respuestas diferentes en bovinos y ovinos consumiendo pasturas frescas de buena calidad. En los bovinos, el incremento en los niveles de suplementación fue efectivo para incrementar el consumo total de alimento y la utilización digestiva de la dieta. Sin embargo, en los ovinos la suplementación con sorgo determinó una caída en el pH ruminal y una reducción en la digestibilidad de la fibra y en el consumo total de alimento. Estos resultados hacen pensar que en este tipo de manejo de la alimentación, los ovinos tienen mayor susceptibilidad a tener episodios de acidosis sub-aguda y/o aguda que los bovinos. Es así, que para lograr buenas respuestas en consumo y aprovechamiento digestivo de la dieta global, cuando se suplementan ovinos consumiendo pasturas de buena calidad deberíamos incluir algún tipo de aditivo que module la fermentación ruminal, o los deberíamos manejar con menores niveles de suplementación que los normalmente utilizados en bovinos.

En ambas especies consumiendo una pastura fresca de buena calidad, la suplementación con grano de sorgo en la dieta disminuyó la concentración hepática del ARNm de la enzima *PCK1*, pero no afectó la abundancia del ARNm de la enzima *PC*. Según estos resultados, parecería que la suplementación con granos a bovinos u ovinos, en balance energético positivo, modificaría el metabolismo hepático para priorizar el uso de propionato como precursor neoglucogénico. Estos resultados, por estar asociados a cambios en la concentración plasmática de glucosa y en el perfil endocrino de los bovinos pero no de los ovinos, indicarían que los efectos de la suplementación sobre el consumo y la digestibilidad de los nutrientes condicionan la magnitud de la respuesta. Los cambios endócrino-metabólicos en los bovinos suplementados indicarían un mayor anabolismo en estos animales, que se asocia a un mayor consumo y digestibilidad de la MO y a una mayor concentración de AGV totales y de propionato en rumen. Probablemente, debido a los efectos de la suplementación a nivel del consumo y de la fermentación ruminal en los ovinos suplementados esta respuesta no fue tan clara.

La adición de agua *per se*, el proceso de germinación o el proceso de ensilaje en granos de sorgo enteros, como factores separados, producen cambios en la composición química, pero no mejoran la digestibilidad del grano de sorgo respecto al grano seco. Sin embargo, la combinación de los procesos de germinación y de ensilaje resulta en cambios en la composición química y en mejoras la utilización digestiva del grano de sorgo. La molienda del grano antes de su reconstitución y ensilaje es una alternativa para mejorar el valor nutritivo del grano de sorgo. Debido a la facilidad de su aplicación a nivel de campo, la reconstitución y ensilaje con el grano previamente molido ofrece ventajas para su aplicación frente al tratamiento germinado y ensilado del grano. Sin embargo, se debe continuar profundizando en el conocimiento de este tratamiento, fundamentalmente en los cambios que produce en las distintas fracciones de carbohidratos y de taninos condensados. A su vez, la investigación en el uso de aditivos que repercutan en una mejor fermentación y en menores niveles de pH luego del tratamiento, sus efectos cuando se aplica a granos cosechados parcialmente secos (niveles de MS entre 75 y 14%), y los efectos de su incorporación en la dieta de animales consumiendo pasturas son desafíos que quedan para el futuro.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Akbar M.A., Lebzien P., Flachowsky G. (2002). Measurement of yield and in situ dry matter degradability of maize varieties harvested at two stages of maturity in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 100:53-70.
2. Amaral G.A., Kozloski G.V., Santos A.B., Castagnino D.S., Fluck A.C., Farenzena R., Alves T.P., Mesquita F.R. (2011). Metabolizable protein and energy supply in lambs fed annual ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) supplemented with sources of protein and energy. *J. Agric. Sci.* 149:519–527.
3. Anguita M., Gasa J., Martín-Orúe S.M., Pérez J.F. (2006). Study of the effect of technological processes on starch hydrolysis, on-starch polysaccharides solubilization and physicochemical properties of different ingredients using a two-step in vitro system *Anim. Feed Sci. Technol.* 129:99-115.
4. A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists (1997). *Methods of Analysis*. 16<sup>th</sup> ed. 3<sup>rd</sup> revision. Gaithersburg, MD, USA.
5. Aschenbach J.R., Kristensen N.B., Donkin S.S., Hammon H.M., Penner G.B. (2010) Gluconeogenesis in Dairy Cows: The Secret of Making Sweet Milk from Sour Dough. *Life*, 62:869-877.
6. Astessiano A.L, Pérez-Clariget R., Quintans G., Soca P., Carriquiry M. (2012) Effects of a short-term increase in the nutritional plane before the mating period on metabolic and endocrine parameters, hepatic gene expression and reproduction in primiparous beef cows on grazing conditions. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 96:535–544.
7. Astessiano A.L, Pérez-Clariget R., Espasandin A.C., López-Mazz C., Soca P., Carriquiry M. (2013) Metabolic, productive and reproductive responses to postpartum short-term supplementation in primiparous beef cows. *Revista Brasileira de Zootecnia* 42:246-253.
8. Bach A., Calsamiglia S., Stern M.D. (2005). Nitrogen metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 88(E. Suppl.):E9–E21.
9. Balogun R.O., Bird S.H., Rowe J.B. (2006). Germination temperature and time affect in vitro fermentability of sorghum grain. *Anim. Feed Sci. Technol.* 127:125-132.
10. Balogun R.O., Rowe J.B., Bird S.H. (2005). Fermentability and degradability of sorghum grain following soaking, aerobic or anaerobic treatment. *Anim. Feed Sci. Technol.* 120:141–150.
11. Bargo F., Muller L.D., Kolver E.S. & Delahoy J.E. (2003). Invited Review: Production and digestion of supplemented dairy cows on pasture. *J. Dairy Sci.* 86:1–42.
12. Bargo F., Muller L.D, Delahoy J.E., Cassidy Y.W. (2002<sup>a</sup>). Performance of High Producing Dairy Cows with Three Different Feeding Systems Combining Pasture and Total Mixed Rations. *J. Dairy Sci.* 85:2948–2963.
13. Bargo F., Muller L.D, Varga G.A., Delahoy J.E., Cassidy Y.W. (2002<sup>b</sup>). Ruminant Digestion and Fermentation of High-Producing Dairy Cows with Three Different Feeding Systems Combining Pasture and Total Mixed Rations. *J. Dairy Sci.* 85:2964–2973.
14. Bargo F., Muller L.D., Delahoy J.E., Cassidy T.W. (2002<sup>c</sup>). Milk response to concentrate supplementation of high producing dairy cows grazing at two pasture allowances. *J. Dairy Sci.* 85:1777–1792.
15. Bauer E., Williams B.A., Voigt C., Mosenthin R., Verstegen M.W.A. (2001). Microbial activities of faeces from unweaned and adult pigs, in relation to selected fermentable carbohydrates. *Anim Sci.* 73:313–322.

16. Berzaghi P., Herbein J.H., Polan C.E. (1996). Intake, Site, of lactating and extent of nutrient digestion cows grazing pasture. *J. Dairy Sci.* 79:1581-1589.
17. Bervejillo J.E., Tambler A. (2013). Carne vacuna: situación y perspectivas. Anuario OPYPA 2013. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,opypa,opypa-anuario-2013,O,es,0>,
18. Bianco A., Goñi V., Oholeguy S. (2000). Efecto del procesado y el contenido de taninos del grano de sorgo sobre la composición química y la digestión de la materia seca en rumiantes. [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)
19. Bobe G., Velez J.C., Beitz D.C., Donkin S.S. (2009). Glucagon increases hepatic mRNA concentrations of ureagenic and gluconeogenic enzymes in early-lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92:5092–5099.
20. Brockman R.P. (1978). Roles of glucagon and insulin in the regulation of metabolism in ruminants: A review. *The Canadian Veterinary Journal* 19:55-59.
21. Cajarville C., Aguerre M., Repetto J.L. (2006). Rumen pH, NH<sub>3</sub>-N concentration and forage degradation kinetics of cows grazing temperate pastures and supplemented with different sources of grain. *Anim. Res.* 55:511-520.
22. Caorsi M.A., Olivera A.P. (2005). Efecto del método de conservación de distintos materiales de grano de sorgo sobre la degradabilidad ruminal y digestibilidad intestinal de la materia seca. Tesis de Grado, Facultad de Agronomía. Montevideo, Uruguay.
23. Carriquiry M., Weber W.J., Fahrenkrug S.C., Crooker B.A. (2009). Hepatic gene expression in multiparous 480stein cows treated with bovine somatotropin and fed n-3 fatty acids in early lactation. *J. Dairy Sci.* 92:4889–4900.
24. Cerrato-Sánchez M., Calsamiglia S., Ferret A. (2007). Effects of time at suboptimal pH on rumen fermentation in a dual-flow continuous culture system. *J. Dairy Sci.* 90:1486–1492.
25. Chen X.B., Gomes M.J. (1992). Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives – An overview of the technical details. International Feed Resources Unit Rowett Research Institute, Bucksburn Aberdeen, Scotland, UK.
26. Cheng S., Yi S., Halgreen L. (2009). The relationships of sorghum kernel pericarp and testa characteristics with tannin content. *Asian J. Crop Sci.* 1(1):1-5.
27. Cipolloni M.A., Schneider B.H., Lucas H.L., HELEN M. Pavlech H.M. (1951). Significance of the differences in digestibility of feeds by cattle and sheep. *J. Anim. Sci.* 10:337-343.
28. Clark J.H., Klusmeyer T.H., Cameron M.R. (1992). Symposium: Nitrogen metabolism and aminoacid nutrition in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 75:2304-2323.
29. Colucci P.E., Macleod G.K., Grovum W.L., McMillan I., Barney D.J. (1990). Digesta kinetics in sheep and cattle fed diets with different forage to concentrate ratios at high and low intakes. *J. Dairy Sci.* 73:2143-2156.
30. Colucci P.E., Macleod G.K., Grovum W.L., Cahill L.W., McMillan I. (1989). Comparative digestion in sheep and cattle fed different forage to concentrate ratios at high and low intakes. *J. Dairy Sci.* 72:1774-1785.
31. Curbelo A. (2010). Ensilaje de granos de sorgo con diferente contenido en taninos: efecto sobre la composición química, degradabilidad ruminal, digestibilidad intestinal y fermentescibilidad. Tesis de Maestría en Ciencias

- Agrarias (Orientación Ciencia Animal). Facultad de Agronomía, UdelaR, Uruguay.
32. Curbelo A., Cajarville C., Melognio E., Ortiz R., Repetto, J.L. (2007). Cinética de degradación ruminal de granos de sorgo: efecto del genotipo y del ensilado. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* 151:368.
  33. D'Alessandro J., Barlocco N., Peinado R., Garín D. (1997). Digestibilidad, balance nitrogenado y energía de granos de sorgo alto y bajo en taninos para cerdos. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 17( Sup. 1).
  34. De Boever J.L., Andrie, J.L., De Brabande, D.L., Cotty, B.G., Buys, F.X., (1990). Chewing activity of ruminants as a measure of 49olstein structure – a review of factors affecting it. *Anim. Feed Sci. Technol.* 27:281-291.
  35. DePeters E.J., Getachew G., Fadel J.G, Corona L., Zinn R.A. (2007). Influence of corn hybrid, protease and methods of processing on in vitro gas production *Anim. Feed Sci. Technol.* 135:157-175.
  36. DIEA (2014). Anuario estadístico agropecuario 2014. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Dirección de Estadísticas Agropecuarias, Uruguay. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-anuario-2014,O,es,0>,
  37. Dixon R. M., Stockdale C.R. (1999). Associative effects between forages and grains: consequences for feed utilization. *Aust. J. Agric. Res.* 50:757–773.
  38. Doepel L., Lobley G.E., Bernier J.F., Dubreuil P., Lapierre, H. (2009) Differences in splanchnic metabolism between late gestation and early lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92:3233–3243.
  39. Drackley J.K., Overton T.R., Douglas G.N. (2001). Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. *J. Dairy Sci.* 84(E. Suppl.):E100-E112.
  40. Duodu K. G., Taylor J. R. N., Belton P. S., Hamaker B. R. (2003). Factors affecting sorghum protein digestibility. *J. of Cereal Sci.* 38:117-131.
  41. Elizalde J.C., Merchen N.R., Faulkner D.B. (1999a). Supplemental cracked corn for steers fed fresh alfalfa: I. Effects on digestion of organic matter, fiber, and starch. *J. Anim. Sci.* 77:457-466.
  42. Elizalde J.C., Merchen N.R., Faulkner D.B. (1999b). Supplemental cracked corn for steers fed fresh alfalfa: II. Protein and amino acid 49olstein49. *J. Anim. Sci.* 77:467–475.
  43. Evers A.D., Blakeney A.B., Brien L.O. (1999). Cereal structure composition. *Aust. J. Agric. Res.* 50:629-650.
  44. Fellner V., Phillip L.E., Sebastian S., Idzcak E.S. (2001). Effect of a bacterial 49olstein49u and propionic acid on preservation of high-moisture ear-corn, and on rumen fermentation, digestion and growth performance of beef cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 81:273-280.
  45. Forbes J.M. (2007). Voluntary food intake and diet selection in farm animals. 2<sup>nd</sup> ed. CABI. Wallingford, UK.
  46. García S.C., Santini F.J., Elizalde J.C. (2000). Sites of digestion and bacterial protein synthesis in dairy heifers fed fresh oats with or without corn or barley grain. *J. Dairy Sci.* 83:746–755.
  47. Greenfield R.B., Cecava M.J., Johnson T.R., Donkin S.S. (2000) Impact of Dietary Protein Amount and Rumen Undegradability on Intake, Peripartum Liver Triglyceride, Plasma Metabolites, and Milk Production in Transition Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 83:703–710.
  48. Groot J.C.J., Cone J.W., Williams B.A., Debersaques F.M.A., Lantinga E.A. (1996). Multiphasic analysis of gas production kinetics for in vitro fermentation of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 64:77–89.

49. Harmon D.L. (1992). Impact of nutrition on pancreatic exocrine and endocrine secretion in ruminants: a review. *J. Anim. Sci.* 70:1290-1301.
50. Herrera-Saldana R.E., Huber J.T., Poore M.H. (1990). Dry matter, crude protein, and starch degradability of five cereal grains. *J. Dairy Sci* 73:2386-2393.
51. Hersom M.J. (2008). Opportunities to enhance performance and efficiency through nutrient synchrony in forage-fed ruminants. *J. Anim. Sci.* 86:E306-E317.
52. Hibberd C.A., Wagner D.G., Schemm R.L., Mitchell E.D. Jr., Hintz R.L., Weibel D.E. (1982a). Nutritive characteristics of different varieties of sorghum and corn grains. *J. Anim. Sci.* 55:665-672.
53. Hibberd C.A., Wagner D.G., Schemm R.L., Mitchell E.D. Jr., Weibel, D.E., Hintz R.L. (1982b). Digestibility characteristics of isolated starch from sorghum and corn grain. *J. Anim. Sci.* 55:1490-1497.
54. Hill T.M., Schmidt S.P., Russell R.W., Thomas E.E., Wolfe D.F. (1991). Comparison of urea treatment with established methods of sorghum grain preservation and processing on site and extent of starch digestion by cattle. *J. Anim. Sci.* 69:4570-4576.
55. Hoffman P.C, Sievert S.J., Shaver R.D., Welch D.A., Combs D.K. (1993). In situ dry matter, protein, and fiber degradation perennial forages. *J. Dairy Sci.* 76:2632-2643.
56. Hoover W.H, Stokes S.R. (1991). Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield. *J. Dairy Sci.* 74:3630-3644.
57. Huck G.L., Kreikemeier K.K., Bolsen K.K. (1999). Effect of 50olstein50outing field-dried and early-harversted sorghum grain on the ensiling characteristics of the grain and on growth performance and carcass merit of feedlot heifers. *J. Anim. Sci.* 77:1074-1081.
58. Hoover W.H. (1986). Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *J. Dairy Sci.* 69:2755-2766.
59. Huntington G.B., Harmon D.L., Richards C.J. (2006). Sites, rates, and limits of starch digestion and glucose metabolism in growing cattle. *J. Anim. Sci.* 84(E. Suppl.):E14–E24.
60. Huntington G.B. (1997). Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. *J. Anim. Sci.* 75: 852-867.
61. INAC (2013). Informe estadístico año agrícola julio 2012 – junio 2013. Dirección de Información y Análisis Económico, Instituto Nacional de Carne, Uruguay. Disponible en: [http://www.inac.gub.uy/innovaportal/v/6754/1/innova.net/informes\\_estadisticos](http://www.inac.gub.uy/innovaportal/v/6754/1/innova.net/informes_estadisticos)
62. Jones-Endsley J.M., Cecava M.J., Johnson T.R. (1997). Effects of dietary supplementation on nutrient digestion and the milk yield of intensively grazed lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:3283–3292.
63. Karcher E.L., Pickett M.M., Varga G.A., Donkin S.S. (2007). Effect of dietary carbohydrate and monensin on expression of gluconeogenic enzymes in liver of transition dairy cows. *J. Anim. Sci.* 85:690-699.
64. Kolver E.S., de Veth M.J. (2002). Prediction of ruminal pH from pasture-based diets. *J. Dairy Sci.* 85:1255–1266.
65. Kolver E.S., Muller L.D. (1998). Performance and nutrient intake of high producing 50olstein cows consuming pasture or a total mixed ration. *J. Dairy Sci.* 81:1403–1411.
66. Kozloski G.V., Rocha J.B.T., Ribeiro Filho H.M.N., Perottoni J. (1999). Comparison of acid and amyloglucosidase hydrolysis for estimation of non-structural polysaccharides in feed samples. *J. Sci. Food. Agric.* 79:1112-1116.

67. Lemosquet S., Delamaire E., Lapierre H., Blum J.W., Peyraud J.L. (2009). Effects of glucose, propionic acid, and nonessential amino acids on glucose metabolism and milk yield in Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92:3244–3257.
68. Licitra G., Hernandez T.M., Van Soest P.J. (1996). Standardization of procedures of nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 57:347–358.
69. López S., Hovell F.F.D., Dijkstra J., France J. (2003) Effects of volatile fatty acid supply on their absorption and on water kinetics in the rumen of sheep sustained by intragastric infusions. *J. Anim. Sci.* 81:2609-2616.
70. Makkar, H.P.S. (2000). Quantification of tannins in tree foliage. FAO /IAEA Working Document IAEA, Vienna, Austria.
71. Martin C., Philippeau C., Michalet-Doreau B. (1999). Effect of wheat and corn variety on fiber digestion in beef steers fed high grain diets. *J. Anim. Sci.* 77:2269-2278.
72. Mauricio R. M., Mould F.L., Dhanoa M.S., Owen E., Channa K.S., Theodorou M.K. (1999). A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 79:321–330.
73. McAllister T. A., Phillippe R. C., Rode L. M., Cheng K. J. (1993). Effect of the Protein Matrix on the Digestion of Cereal Grain by Ruminal Microorganisms. *J. Anim. Sci.* 71:205-212.
74. McEvoy M., Kennedy E., Murphy J.P., Boland T.M., Delaby L., O'Donovan M. (2008). The effect of herbage allowance and concentrate supplementation on milk production performance and dry matter intake of spring-calving dairy cows in early lactation. *J. Dairy Sci.* 91:1258–1269.
75. Mertens D.R. (2002). Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. *Journal of AOAC international.* 85:1217-1240.
76. Mertens D.R., Ely L.O. (1982). Relationship of rate and extent of digestion to forage utilization – a dynamic model evaluation. *J. Anim. Sci.* 54:895-905.
77. Methol M. (2013). Maíz y sorgo: situación y perspectivas. Anuario OPYPA 2013. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, Uruguay. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,opypa,opypa-anuario-2013,O.es,0>,
78. Mould F.L., Morgan R., Kliem K.E., Krystallidou E. (2005). A review and simplification of the in vitro incubation medium. *Anim. Feed Sci. and Technol.* 124:155–172.
79. Montiel M.D., Elizalde J.C., Santini, F, Giorda, L. (2011). Características físicas y químicas del grano de sorgo. Relación con la degradación ruminal en bovinos. *Arch. Zootec.* 60 (231):533-541.
80. Montiel M.D., Elizalde J.C. (2004). Factores que afectan la utilización ruminal del grano de sorgo en vacunos. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 24 (1-2):1-20.
81. Nocek J.E., Russell J.B. (1988). Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. *J. Dairy Sci.* 71:2070-2107.
82. NRC. (2007) Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids and new world camelids, 1° ed. National Academy Press, Washington, D.C, USA.
83. NRC. (2001). Nutrient requirements of dairy cattle. Ed. National Academy Press, 7° ed. Washington D.C., USA.
84. NRC. (1996). Nutrient requirements of beef cattle. Ed. National Academy Press, 7° ed. Washington D.C., USA.
85. Offner A., Bach A., Sauvant D. (2003). Quantitative review of in situ starch degradation in the rumen. *Anim. Feed Sci. And Technol.* 106:81–93.

86. Owens F.N., Zinn R.A. (2005). Corn Grain for Cattle: Influence of Processing on Site and Extent of Digestion. Proc. Southwest Nutr. Conf.: 86-112.
87. Owens F.N., Secrist D.S., Hill W.J., Gill D.R. (1997). The effect of grain source and grain processing on performance of feedlot cattle: a review. J. Anim. Sci. 75: 868-879.
88. Pflugfelder R.L., Rooney L.W., Schake L.M. (1986). The role of germination in sorghum reconstitution. Anim. Feed Sci. Technol. 14:243-254.
89. Philippeau C., Martin C., Michalet-Doreau B. (1999). Influence of grain source on ruminal characteristics and rate, site and extent of digestions in beef steers. J. Anim. Sci. 77:1587-1596.
90. Playne N.J. (1978). Differences between cattle and sheep in their digestion and relative intake of a mature tropical grass hay. Anim. Feed Sci. and Technol. 3: 41-49.
91. Poore M.H., Moore J.A., Eck T.P., Swingle R.S., Theurer C.B. (1993). Effect of fiber source and ruminal starch degradability on site and extent of digestion in dairy cows. J. Dairy Sci. 76:2244-2253.
92. Preston T.R. (1995). Tropical animal feeding. A manual for research workers. FAO animal production and health paper 126. FAO Publications Division, Rome, Italy.
93. Recalde E. (2013). Producción ovina: situación y perspectivas. Anuario OPYPA 2013. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,opypa,opypa-anuario-2013,O,es,0>
94. Reed J.D. (1995). Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. J. Anim. Sci. 73:1516-1528.
95. Reid R.L., Jung G.A., Cox-Ganser J.M., Rybeck B.F., Townsend E.C. (1990). Comparative utilization of warm- and cool-season forages by cattle, sheep and goats. J. Anim. Sci. 68:2986-2994.
96. Reis R.B., Combs D.K. (2000). Effects of increasing levels of grain supplementation on rumen environment and lactation performance of dairy cows grazing grass-legume pasture. J. Dairy Sci. 83:2888-2898.
97. Repetto J.L., Cajarville C., D' Alessandro J., Curbelo A., Soto C., Garin D. (2005). Effect of wilting and ensiling on ruminal degradability of temperate grass and legume mixtures. Anim. Res. 54:73-78.
98. Reynolds C.K., Aikman P.C., Lupoli B., Humphries D.J., Beaver D.E. (2003). Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. J. Dairy Sci. 86:1201-1217.
99. Reynolds C.K., Harmon D.L., Cecava M.J. (1994) Absorption and delivery of nutrients for milk protein synthesis by portal-drained viscera. J. Dairy Sci. 77:2787-2808.
100. Reynolds C.K., Huntington G.B., Turrell H.F., Reynolds P.J. (1988). Net metabolism of volatile fatty acids, D-β-hydroxybutyrate, nonesterified fatty acids, and blood gasses by portal-drained viscera and liver of lactating 520stein cows. J. Dairy Sci. 71:2395-2405.
101. Rozen S., Skaletsky H.J. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S.; Misener, S., (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386
102. Rooney L.W., Pflugfelder R.L. (1986). Factors affecting starch digestibility with special emphasis on sorghum and corn. J. Anim. Sci. 63:1607-1623.
103. Russell R.W., Lolley J.R. (1989). Deactivation of tannin in high tannin milo by treatment with urea. J. Dairy Sci. 72: 2427-2430.

104. Sairanen A., Khalili H., Nousiainen J.L., Ahvenjarvi S., Huhtanen P. (2005). The effect of concentrate supplementation on nutrient flow to the omasum in dairy cows receiving freshly cut grass. *J. Dairy Sci.* 88:1443–1453.
105. She P., Lindberg G.L., Hippen A.R., Beitz D.C., Young J.W. (1999). Regulation of messenger ribonucleic acid expression for gluconeogenic enzymes during glucagon infusions into lactating cows. *J. Dairy Sci.* 82:1153–1163.
106. Simpson Jr. E.J., Schake L.M., Pflugfelder R.L., Riggs J.K. (1985). Evaluation of moisture uptake, aerobic and anaerobic phases of reconstitution upon sorghum grain digestibility and performance of steers. *J. Anim. Sci.* 60:877-882.
107. Stock R. (1999). Nutritional benefits of specialty grain hybrids in beef feedlot diets. *J. Anim. Sci.* 77 (Suppl. 2): 208-212.
108. Stockdale C. R. (2000). Levels of pasture substitution when concentrates are fed to grazing dairy cows in northern Victoria. *Aust. J. Exp. Agric.* 40:913–921.
109. Südekum K.H., Röh, H., Brandt M., Rave G., Stangassinger M. (1995). Comparative digestion in cattle and sheep fed wheat silage diets at low and high intakes. *J. Dairy Sci.* 78:1498-1511.
110. Swingle R.S., Eck T.P., Theurer C.B., De la Llata M., Poore M.H., Moore J.A. (1999). Flake density of steam-processed sorghum grain alters performance and sites of digestibility by growing-finishing steers. *J. Anim. Sci.* 77:1055-1065.
111. Tebot I., Cajarville C., Repetto J.L., Cirio A. (2012). Supplementation with non-fibrous carbohydrates reduced fiber digestibility and did not improve microbial protein synthesis in sheep fed fresh forage of two nutritive values. *Animal.* 6:617-623.
112. Theurer C.B, Lozano O., Alio A., Delgado-Elorduy A., Sadik M., Huber J.T., Zinn R.A. (1999). Steam-Processed corn and sorghum grain flaked at different densities alter ruminal, small intestinal, and total tract digestibility of starch by Steers. *J. Anim. Sci.* 77:2824-2831.
113. Torterolo M., Curbelo A., Cajarville C., Repetto J.L., Aguerre M. (2012). Silage process affects chemical composition and digestion site in high moisture sorghum grain. *J. Anim. Sci.* 90 (Suppl. 3): 201.
114. Udén P., Sjaunja L.O. (2009). Estimating volatile fatty acid concentrations in rumen samples by Fourier transform mid-IR transmission spectroscopy. *Anim. Feed Sci. and Technol.* 152: 123-132.
115. Van Soest P.J. (1994). Nutritional ecology of the ruminant. Ed. Cornell University Press. 2<sup>o</sup> ed. New York.
116. van Vuuren A.M., Van Der Koelen C.J., Vroonede Bruin J. (1993). Ryegrass versus corn starch or beet pulp fiber diet effects on digestion and intestinal amino acids in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76:2692-2700.
117. Vazquez O.P., Smith T.R. (2000). Factors affecting pasture intake and total dry matter intake in grazing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83:2301–2309.
118. Velez J.C., Donkin S.S. (2005). Feed restriction induces pyruvate carboxylase but not phosphoenolpyruvate carboxykinase in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88:2938–2948.
119. Vidal M.E. (2013). Lácteos: situación y perspectivas. Anuario OPYPA 2013. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,opypa,opypa-anuario-2013,O,es,0>,

120. Vidal M.E., Ilundain M. (2002). Producción lechera: situación actual y perspectivas. Anuario OPYPA 2002. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/opypa/PUBLICACIONES/Publicaciones.htm>
121. Viñoles C., Forsberg M., Martin G.B., Cajarville C., Repetto J., Meikle, A. (2005) Short-term nutritional supplementation of ewes in low body condition affects follicle development due to an increase in glucose and metabolic hormones. *Reproduction* 129:299-309.
122. Vona L.C., Jung G.A., Reid R.L., Sharp W.C. (1984). Nutritive value of warm-season grass hays for beef cattle and sheep; digestibility, intake and mineral utilization. *J. Anim. Sci.* 59:1582-1593.

## 11. ANEXO

**Artículo I:** Aguerre M., Cajarville C., Kozloski G.V., Repetto J.L. (2013). Intake and digestive responses by ruminants fed fresh temperate pasture supplemented with increased levels of sorghum grain: a comparison between cattle and sheep. *Animal Feed Science and Technology*. 186: 12-19.

**Artículo II:** Aguerre M., Carriquiry M., Astessiano A.L., Cajarville C., Repetto J.L. (2015). Effect of sorghum grain supplementation on glucose metabolism in cattle and sheep fed temperate pasture. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 99: 465–473.

**Artículo III:** Aguerre M., Cajarville C., Repetto J.L. (2015). Impact of water addition, germination, ensiling and their association on sorghum grain nutritive value. *Animal Feed Science and Technology*. 205: 75-81.