



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**COMBINACIÓN DE DIFERENTES NIVELES DE RAIGRÁS Y RACIÓN
TOTALMENTE MEZCLADA EN DIETAS DE VACAS LECHERAS: EFECTO
SOBRE EL DESEMPEÑO PRODUCTIVO Y EFICIENCIA DE UTILIZACIÓN
DE LOS NUTRIENTES**

Maximiliano PASTORINI CORLETO

TESIS DE MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL

**URUGUAY
2016**



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**COMBINACIÓN DE DIFERENTES NIVELES DE RAIGRÁS Y RACIÓN
TOTALMENTE MEZCLADA EN DIETAS DE VACAS LECHERAS: EFECTO
SOBRE EL DESEMPEÑO PRODUCTIVO Y EFICIENCIA DE UTILIZACIÓN
DE LOS NUTRIENTES**

Maximiliano PASTORINI CORLETO

José Luis Repetto, Prof. PhD	Cecilia Cajarville, Prof. PhD	Alejandro Mendoza, Msc
Director de Tesis	Co-director	Co-director

2016

INTEGRACIÓN DE TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

Santiago Rafael Fariña; Ing. Agr., PhD

Director de Programa de Bovinos para Leche

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria – Uruguay

Rafael Alejandro Palladino; Ing. Agr., PhD

Cátedra de Producción Lechera – Facultad de Agronomía

Universidad de Buenos Aires – Argentina

Henrique Ribeiro Filho; Dr. Vet., PhD

Coordinador de Programa de Investigación y Posgraduación en ciencias Agrarias.

Universidad Estadual de Santa Catarina – Lages - Brasil



FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS
DE MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL

Combinación de diferentes niveles de raigrás y ración totalmente mezclada en dietas de vacas lecheras: efecto sobre el desempeño productivo y eficiencia de la utilización de los nutrientes

Por: Dr. Maximiliano PASTORINI CORLETO

Director de Tesis: Dr. José Luis Repetto
Codirectores de Tesis: Dra. Cecilia Cajarville
Mag. Alejandro Mendoza

Tribunal

Presidente: Dr. Santiago Fariña
Segundo Miembro: Dr. Alejandro Palladino
Tercer Miembro: Dr. Henrique Ribeiro Filho

Fallo del Tribunal: S.S.S. - 12

IPAV, Libertad, San José
Lunes 12 de diciembre de 2016

AGRADECIMIENTOS:

A Joselo y Cecilia por la oportunidad de realizar este trabajo, su guía y enseñanzas en la realización del mismo.

A Alejandro Mendoza, por su paciencia, dedicación y apoyo constante en todo este camino recorrido.

A Elena de Torres, por el apoyo brindado durante el experimento y en toda esta etapa de formación.

A Nicolle por compartir tu vida y el experimento conmigo y por enseñarme todos los días de que se trata ser una persona exitosa.

A todos los tesistas de grado que participaron del experimento y en la realización de los análisis: Irina, Irene, Pilar, Valeria, Nadia, Yohana, Mauricio, Mathías, Emiliano, Matías, Lucho y Willy y a Fabiana y Tahís pasantes brasileñas. Sin ellos hubiera sido imposible la realización de este trabajo.

A mis compañeros de trabajo del Campo Experimental por el apoyo diario: Federico, Damián, Gustavo, Isabel, Aurelia, en especial a Adriana, Matías y Alejandro por soportarnos en el tambo.

A todos los compañeros de Nutrición y Bovinos: Germán, Álvaro, Carolina, Martín, Alejandro, Sebastián, Analía y Alicia por su apoyo y colaboración en las diferentes etapas de este trabajo.

A mi familia y amigos por su apoyo, aguantar ausencias y saber siempre de que lado del carro empujar.

A las integrantes del Laboratorio de Técnicas Nucleares por su apoyo en la realización de análisis, en especial a Gretel e Isabel.

A Pablo Sunino y Martín Fraga por permitirnos la utilización del laboratorio de microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

A Colaveco por el apoyo en los análisis de composición de la leche, en especial a Darío, Marina y Mauricio.

A Insalcor y Elanco (especialmente a Eduardo Melonio) por colaborar con aditivos para la formulación de la RTM.

TABLA DE CONTENIDOS

1	RESUMEN	8
2	ABSTRACT	9
3	INTRODUCCIÓN	10
4	ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	12
4.1	CONSUMO DE NUTRIENTES Y MECANISMOS DE REGULACIÓN EN VACAS LECHERAS.	12
4.2	PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LECHE EN VACAS LECHERAS DE ALTA PRODUCCIÓN.	14
4.3	METABOLISMO, UTILIZACIÓN DEL NITRÓGENO Y SÍNTESIS DE PROTEÍNA MICROBIANA EN VACAS LECHERAS.	18
4.4	METABOLISMO DE LA GLUCOSA E INSULINA EN VACAS LECHERAS.	20
5	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
6	HIPÓTESIS.....	25
7	OBJETIVOS	25
7.1	OBJETIVO GENERAL:	25
7.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	25
8	MATERIALES Y MÉTODOS	26
8.1	DISEÑO EXPERIMENTAL	26
8.2	MANEJO DE LOS ANIMALES Y ALIMENTACIÓN	26
8.3	MEDICIONES Y CÁLCULOS:	29
8.4	COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ALIMENTOS.	33
8.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	33
9	RESULTADOS	35
9.1	CONSUMO Y DIGESTIBILIDAD.....	35
9.2	BALANCE DE NITRÓGENO.	35
9.3	DERIVADOS PÚRICOS Y FLUJO DE N MICROBIANO A DUODENO.	36
9.4	PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA LECHE.	37
9.5	PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS E ÍNDICE DE ATEROGENICIDAD.	38
9.6	METABOLITOS Y HORMONAS SANGUÍNEAS.	40
9.7	EFICIENCIA DE UTILIZACIÓN DE MS, DE UTILIZACIÓN DEL N Y DE UTILIZACIÓN DE LA ENERGÍA.	43
10	DISCUSIÓN.....	44
11	CONCLUSIONES	51
12	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

	Página
Cuadro I. Composición química del forraje fresco (<i>Lolium multiflorum</i>), la RTM y de los alimentos utilizados para formular la RTM.	25
Cuadro II. Ingredientes de la ración totalmente mezclada.	26
Cuadro III. Consumo y digestibilidad de la materia seca y materia orgánica en vacas lecheras de alta producción alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF.	32
Cuadro IV. Consumo, partición y balance de N en vacas lecheras de alta producción alimentadas con diferentes combinaciones de RTM y FF.	33
Cuadro V. Producción de derivados púricos en orina y flujo de proteína microbiana a duodeno en vacas lecheras de alta producción alimentadas con diferentes combinaciones de RTM y FF.	34
Cuadro VI. Producción y composición de leche de vacas lecheras de alta producción alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF.	35
Cuadro VII. Perfil de ácidos grasos de la leche de vacas lecheras de alta producción alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF.	36
Cuadro VIII. Saturación, origen e índice de aterogenicidad de la grasa de la leche de vacas lecheras de alta producción alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF.	37
Cuadro IX. Eficiencias de utilización de la MS, N digestible y E digestible en vacas lecheras de alta producción alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF.	40
Figura 1. Esquema de las determinaciones experimentales.	26
Figura 2. Nivel de urea en sangre de vacas Holando alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF.	38
Figura 3. Nivel de glucosa en sangre de vacas alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF.	39
Figura 4. Nivel de insulina en sangre de vacas alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF.	39

LISTA DE ABREVIATURAS.

AG:	Ácidos grasos
AGI:	Ácidos grasos insaturados
AGMI:	Ácidos grasos mono-insaturados
AGPI:	Ácidos grasos poli-insaturados
AGS:	Ácidos grasos saturados
AGV:	Ácidos grasos volátiles
BUN:	Nitrógeno ureico en sangre
CMOD:	Consumo de materia orgánica digestible
CMS:	Consumo de materia seca
CNF:	Carbohidratos no fibrosos
DE:	Desvío estándar
DP:	Derivados púricos
ED:	Energía digestible
ESPM:	Eficiencia de síntesis de proteína microbiana
EUED:	Eficiencia de utilización de la energía digestible
EUMS:	Eficiencia de utilización de la materia seca
EUND:	Eficiencia de utilización del nitrógeno digestible
EUN-NM:	Eficiencia de utilización del nitrógeno para nitrógeno microbiano
FAD:	Fibra ácido detergente
FAD_i:	Fibra ácido detergente indigestible
FF:	Forraje fresco
FND:	Fibra neutro detergente
FNM:	Flujo de nitrógeno microbiano al duodeno
LI:	Ácido linolénico
LN:	Ácido linoleico
MO:	Materia orgánica
MS:	Materia seca
MUN:	Nitrógeno ureico en leche
N-NH₃:	Nitrógeno amoniacal
NTD:	Nutrientes totales digestibles
PA:	Absorción total de purinas
PB:	Proteína bruta
RPM:	Ración parcialmente mezclada
RTM:	Ración totalmente mezclada
RU:	Ácido ruménico
VA:	Ácido vaccénico

1. RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de suministrar diferentes proporciones de forraje fresco (FF) de alta calidad en una dieta a base de ración totalmente mezclada (RTM) sobre el desempeño productivo y la eficiencia de utilización de los nutrientes de vacas lecheras de alta producción. Se utilizaron 12 vacas Holando con 90 ± 22 días de lactancia, 523 ± 88 kg de peso vivo y 7908 ± 719 kg de leche de producción en la lactancia anterior, las cuales fueron alojadas en bretes individuales. Se utilizó un diseño de cuadrado latino 3×3 por cuadruplicado, asignándose los animales a uno de los siguientes 3 tratamientos: 1) RTM100: 100% RTM; 2) RTM75: 75% RTM + 25% FF; y 3) RTM50: 50% RTM + 50% FF. El experimento tuvo una duración total de 66 días, divididos en 3 períodos de 22 días cada uno, donde los primeros 11 días fueron de adaptación y los 11 días siguientes de mediciones. La RTM fue preparada diariamente, y el FF utilizado fue Raigrás anual (*Lolium multiflorum*) el cual se cortó diariamente y así fue ofrecido en los comederos individuales. El consumo de MS fue mayor en RTM100 y RTM75 con respecto a RTM50. Tanto el consumo de N como el balance de N fue mayor en RTM100 y RTM75 respecto de RTM50. El flujo de N microbiano al duodeno (g/d) fue afectado por el tratamiento siendo menor en el tratamiento RTM50, sin embargo no se observó diferencias entre tratamientos en la eficiencia de utilización del N, ni la eficiencia de utilización de la materia orgánica digestible para síntesis de N microbiano. La producción de leche, leche corregida por grasa al 3,5%, producción de grasa, proteína, lactosa y caseína total fue mayor en RTM100 y RTM75 respecto de RTM50. El N ureico en leche fue menor en RTM50 respecto a RTM100 y RTM75. Se observó que RTM50 tuvo mayor contenido de ácidos grasos insaturados, y particularmente de ácido Linoleico, Vaccénico, Linolénico y Ruménico respecto a los restantes tratamiento. Para la urea en sangre se observaron diferencias entre tratamientos siendo mayor en RTM100 y menor en RTM50, presentando RTM75 un valor intermedio. La glucemia fue mayor en RTM100 respecto de RTM50 y la insulinemia no fue afectada por el tratamiento. La inclusión de un 30% de FF en la dieta de vacas lecheras alimentadas a base de RTM disminuye el consumo de MS, producción de leche y otros factores que hacen al aprovechamiento digestivo de los nutrientes, pero en contraposición mejoraría aspectos vinculados a la composición de la grasa que harían a este productos un alimento más saludable para los consumidores.

2. ABSTRACT

The objective of this study was to determine the effect of providing different proportions of high-quality fresh forage (FF) in a based diet of total mixed ration (TMR) on the on productive performance and efficiency of nutrient utilization of high production dairy cows. Twelve dairy cows of 90 ± 22 DIM, 523 ± 88 BW and 7908 ± 719 kg of milk production in the previous lactation were used on a four 3 X 3 latin square design. Animals were housed in individual stalls and were assigned to one of the following treatments: 1) RTM100: 100% TMR; 2) RTM75: 75% TMR + 25% FF; y 3) RTM50: 50% TMR + 50% FF. The experiment lasted a total of 66 days, divided into 3 periods of 22 days each, where the first 11 days were for adaptation and the following 11 days of measurements. The TMR was prepared daily, and the FF (*Lolium multiflorum*) cut and offered daily and offered in individual feeders. Dry matter intake was higher in RTM100 and RTM75 compared to RTM50. N intake and N balance was higher in RTM100 and RTM75 than in RTM50. Microbial N flow to the duodenum (g/d) was affected by the treatment, being lower in RTM50 than in RTM75 and RTM100. However N and digestible organic matter utilization efficiency for synthesis of N microbial was not affected by treatment. Milk, 3.5% FCM, fat, protein, lactose and total casein yield were higher in RTM100 and RTM75 than in RTM50. The MUN were lower in RTM50. It was observed that RTM50 had higher content of unsaturated fatty acid, particularly linoleic, vaccenic, linolenic and rumenic acids respect to RTM75 and RTM100. Dfferences in BUN is observed between treatments being higher in RTM100 and lower in RTM50, RTM75 presenting an intermediate value. Blood glucose was higher in RTM100 than in RTM50 and insulin was not affected by treatment. The inclusion of 30% of FF in the diet of dairy cows fed on RTM decreases DM intake, milk production and other factors that affect the digestive use of nutrients, but in contrast would improve aspects related to the composition of the fat that would make this product a healthier food for consumers.

3. INTRODUCCIÓN

La base alimenticia de los sistemas de producción animal en Uruguay es principalmente pastoril. En las producciones semi-intensivas como la lechería, las pasturas de alta calidad representan aproximadamente entre el 40 y el 50% de la dieta (Chilibroste & Battezzato, 2014). Este hecho contribuye a una mejor relación costo/beneficio de la alimentación de los animales (Chaudry, 2008) ya que las pasturas usualmente son un alimento más económico que las raciones totalmente mezcladas (**RTM**) (Dillon, 2006). Sumado a esto, la inclusión de pastura contribuye en la diferenciación en la calidad del producto final y sus propiedades nutraceuticas (Chaudry, 2008), ya que se ha comprobado que los productos de rumiantes (carne y leche) alimentados con pasturas presentan características nutricionales deseables para la salud humana, particularmente en lo que refiere al perfil de ácidos grasos, donde se destacan los altos contenidos de ácido ruménico con propiedades anti-cancerígenas (Kelley *et al.*, 2007) y vaccénico (Elgersma *et al.*, 2006). Además, los sistemas pastoriles pueden tener beneficios sobre la salud de los animales, respecto a sistemas de confinamiento, y desde este punto de vista se considera que promueven un mayor bienestar de los mismos (Rushen *et al.*, 2008).

En los sistemas pastoriles, tanto el consumo de materia seca (**MS**) como el consumo de nutrientes, y particularmente el consumo de energía, que las vacas pueden alcanzar es menor respecto a cuando son alimentadas con RTM, y en consecuencia, el potencial de producción de leche no se explota completamente (Kolver, 2003), especialmente en la lactancia temprana (Morales-Almaráz *et al.*, 2010). Esto es debido a restricciones de tipo físicas (digestión y pasaje de material por el tracto digestivo), por limitación del tiempo de alimentación (para actividades de búsqueda, cosecha y rumia del forraje ingerido), y por la alta cantidad de agua ingerida junto a la pastura (Dillon, 2006). Además, el consumo de nutrientes no puede ser predicho con tanta precisión como en sistemas de confinamiento, debido a que las vacas se enfrentan a una situación donde el alimento ofrecido puede cambiar rápidamente tanto en cantidad como en composición, pudiendo además ejercer selectividad sobre la pastura ofrecida. Las vacas en pastoreo también presentan costos de energía que no están presentes en situaciones de confinamiento y que están vinculados a las caminatas y a la búsqueda y cosecha de la pastura (Kolver, 2003).

Las RTM son un sistema de alimentación donde los alimentos concentrados y forrajes son ofrecidos a los animales completamente mezclados en una única ración. Esta mezcla de distintos ingredientes presenta varias ventajas entre las que se destaca la posibilidad de ofrecer una dieta con un aporte balanceado de nutrientes y una óptima relación forraje – concentrado, disminuyendo la posibilidad de selección de los componentes individuales de la ración. Asimismo, esto determina una formulación de la dieta más precisa que cuando se ofrecen los ingredientes por separado y proveerían al rumiante una fuente más sincronizada de nutrientes a nivel ruminal (Gill, 1979; Coppock *et al.*, 1981).

Sin embargo, el uso exclusivo de dietas de tipo RTM podría no ser adecuado para implementar en tambos cuyo sistema de alimentación sea de base pastoril, donde la pastura constituye entre 40 y 60% de la MS total consumida por los animales, teniendo en cuenta que es muy difícil incorporar pasturas frescas a la RTM por un problema de volumen y de capacidad de mezclado. Como estrategia alimenticia en estos sistemas se ha comenzado a utilizar raciones parcialmente mezcladas (**RPM**), es decir, dietas que

combinan RTM y pastura fresca, pero que se ofrecen de forma separada. La utilización de cualquiera de estos sistemas supone cambios fisiológicos y productivos en los animales a los cuales se los asignan y la magnitud de estos cambios estará determinada según como se utilicen estos sistemas. Por lo tanto, en nuestro trabajo se propone cuantificar estos cambios en función de cuál sea la estrategia de utilización de RTM y FF en la dieta de vacas lecheras.

4. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

La rentabilidad y la sostenibilidad tanto de los sistemas lecheros pastoriles, en confinamiento, como en los sistemas mixtos, dependen del uso eficiente de los recursos destinados a la alimentación de los rodeos, además de lograr niveles de producción individual razonables para cada sistema.

Cada sistema de alimentación posee sus ventajas y desventajas, pero cuando se comienzan a utilizar de manera combinada en los sistemas lecheros, como es el caso de las RPM, comienzan a aparecer interacciones en los diferentes parámetros fisiológicos del animal así como en parámetros productivos. Estas interacciones pueden afectar parámetros como el consumo, digestibilidad, aprovechamiento digestivo ruminal e incluso la síntesis de proteína microbiana a ese nivel y la cantidad de la misma que llegue al duodeno. Como consecuencia se podrá afectar la eficiencia con que los animales utilizan los diferentes nutrientes, la producción y composición de la leche.

La magnitud de estos cambios quedará reflejada en mayor o menor medida según como se utilicen estos recursos y de qué manera estén combinados en los diferentes sistemas.

4.1 Consumo de nutrientes y mecanismos de regulación en vacas lecheras.

Uno de los factores más importantes que determina la performance animal es el consumo de alimento. El consumo está regulado por mecanismos que actúan a largo y corto plazo, a través de estímulos físicos, químicos, metabólicos y neuro-hormonales. Este control está relacionado con la regulación del balance energético del animal, siendo el equilibrio energético el primer responsable del control integrado de la ingestión de alimentos (Coelho, 2011). Distintas teorías proponen que el consumo está regulado por la integración de factores internos y externos del animal que afectan tanto la sensación de hambre y saciedad (Allen, 2000). Cada teoría podría ser aplicable en algunas condiciones, pero lo más probable es que sea el efecto aditivo de varios de estos estímulos los que en conjunto ejercen un efectivo control del consumo (Forbes, 1996).

Cada animal tiene una tasa máxima a la que puede utilizar los nutrientes y combustibles metabólicos y, a menos que el consumo de MS (CMS) esté limitado por la capacidad física, existen mecanismos que equilibran el consumo con la demanda de nutrientes. En este sentido, el nivel de llenado del rumen juega un importante papel en la regulación, lo que es corroborado por el hecho de que al reducir el tamaño de partícula o cuando aumenta la digestibilidad aumenta el consumo (Faverdin y Bareille, 1999). Sin embargo esa limitación física no ha sido capaz de explicar todas las variaciones que ocurren en el consumo (Forbes, 1996).

Según Mertens (1994), la fibra neutro detergente (FND) sería la única característica del alimento útil para predecir el efecto de llenado de ruminal y el contenido de energía de las dietas, ya que el CMS se correlacionó positivamente con la concentración de FND cuando la energía es limitante, y negativamente cuando el llenado ruminal es quien limita el consumo. Cambiar el contenido de FND de una dieta sustituyendo grano por forraje debe dar lugar a una respuesta cuadrática en el CMS; el consumo aumenta ya que no se ve limitado por efecto del llenado ruminal, pero disminuye por la presencia de un exceso de combustibles metabólicos.

El grado de estimulación de los receptores epiteliales ruminales por los diferentes combustibles metabólicos como los ácidos grasos volátiles (**AGV**) y posiblemente electrolitos, y de los receptores hepáticos por propionato, está determinada por la velocidad y el grado de fermentación de alimentos a nivel ruminal (Allen, 2000). En este sentido, hay evidencias de que el propionato tendría un mayor efecto depresor del CMS que el acetato (Choi y Allen, 1999).

4.1.1 Combinación de pastura y ración totalmente mezclada: Efectos sobre el consumo de materia seca.

Las vacas lecheras de alta producción consumiendo una dieta exclusivamente a base de pastura pueden lograr un consumo total de MS de 3.25% del peso vivo (Leaver, 1985). En situaciones donde la disponibilidad de pastura no es limitante (kgMS/ha), el consumo de forraje depende de la calidad y de la oferta de forraje por animal (Hoover, 1986; Stockdale, 2000a; Vazquez y Smith, 2000; Bargo *et al.* 2002a; Bargo *et al.* 2003), pudiendo lograrse consumos de MS de 3.5% del peso vivo (Bargo *et al.* 2002a).

Bargo *et al.* (2002a) reportan un aumento de consumo de 17,5 a 20,5 kgMS/día en vacas lecheras, cuando la disponibilidad de forraje por animal pasó de 25 a 40 kgMS/vaca/día. En el mismo sentido, Stockdale (2000b) reporta un aumento en el consumo de MS del 35% cuando la disponibilidad de pastura por animal se duplicó de 27 a 54 kgMS/vaca/día. Asimismo, Bargo *et al.* (2003) observaron que en animales que consumen pastura templada como único alimento, la oferta de forraje por animal debe ser de 3 a 5 veces superior al consumo potencial de manera que los animales puedan maximizar el consumo de MS. Sin embargo, Kolver y Muller (1998), estudiando el consumo y nivel de producción de vacas lecheras, compararon vacas alimentadas a bases de pastura de buena calidad como único alimento, o una ración totalmente mezclada (**RTM**), y observaron que el consumo de MS fue 23% superior en las que recibieron RTM respecto de las que recibieron solo pastura.

En un estudio realizado por Vibart *et al.* (2008) se observó que el aumento en la proporción de raigrás anual en estado vegetativo de 21 a 41% (base seca) en una dieta mixta compuesta por pastura + RTM no afectó el consumo de MS total, aunque con la misma pastura pero en un estado más avanzado de madurez, el aumento de la proporción de pastura de 11 a 35% (base seca) redujo el consumo total de MS. Del mismo modo cuando se comparó un grupo vacas lecheras alimentadas exclusivamente con una dieta RTM frente a otros dos grupos con acceso 6 o 12 h a pastura (lo que significa un consumo de 21 a 37% de MS proveniente de la pastura en la dieta), no se observa diferencias en el consumo de MS total (Morales-Almaráz *et al.*, 2010). En el mismo sentido, en un trabajo realizado por Soriano *et al.* (2001) donde se comparó el consumo de vacas lecheras alimentadas con RTM, RTM + pastoreo AM y RTM + pastoreo PM, los autores reportan que cuando la pastura ocupa entre un 23 a 34% de la MS total no existe una reducción del consumo de MS.

Por otro lado, Bargo *et al.* (2002b) en un trabajo donde compararon vacas alimentadas con una dieta 100% RTM vs RPM (50% RTM + 50 % pastura) y pastura + concentrado, reportan que a mayor inclusión de pastura en la dieta, menor fue el consumo total de MS, disminuyendo aproximadamente un 19% el consumo de MS entre los tratamientos 100 % RTM y pastura + concentrado. Finalmente, Mendoza *et al.* (2016), en un trabajo realizado en condiciones similares a las que se pretende tener en este experimento, en donde vacas alimentadas con RTM tuvieron 0 (RTM0), 4 (RTM4) u 8 h (RTM8) de

acceso a forraje fresco (FF), observaron que a medida que aumenta el tiempo de acceso al mismo, el consumo de MS de FF aumenta pero el consumo de MS de RTM disminuye de 24,5 kg/d (RTM0) a 19,0 kg/d (RTM8). Respecto al consumo de MS total, RTM4 presentó mayor consumo de MS que RTM8, mientras que RTM0 no difirió de ambos, alcanzando valores promedios de 25,6, 24,5 y 22,6 kg/d para RTM4, RTM0 y RTM8 respectivamente.

4.2 Producción y composición de leche en vacas lecheras de alta producción.

4.2.1 Producción de leche en base a pasturas de alta calidad.

A nivel nacional, a pesar de que los sistemas de producción de leche han sufrido un proceso de intensificación, las pasturas continúan representando aproximadamente un 50% de la dieta (Chilibroste & Battegazzore, 2014). Este hecho no solo se explica debido a la mejor relación costo/beneficio de la alimentación a base de pastura, sino también por su imagen de sistemas más amigables con el medio ambiente y el bienestar animal y la diferenciación en calidad de los productos finales (Chaudry, 2008).

Sin embargo, la utilización de pasturas como única fuente de alimentación podría tener importantes limitantes para explotar al máximo el potencial productivo de vacas lecheras de alta producción. En este sentido, la baja concentración energética, y los altos contenidos de humedad y fibra de las pasturas pueden resultar en bajos consumos de MS y energía por los animales (NRC, 2001).

Asimismo, las fluctuaciones en la disponibilidad y cambios en la composición química de las pasturas hacen muy difícil predecir el consumo de nutrientes en animales a pastoreo. Por este motivo, se han utilizado diferentes estrategias de alimentación (suplementación con concentrados o con RTM) y de manejo del pastoreo (carga animal y asignación de pastura), de manera de maximizar la utilización del forraje y el potencial productivo animal.

Existen en la literatura diferentes trabajos que analizan la producción de leche sobre pasturas. En este sentido, Van Vuuren *et al.* (2006) indican que en pastoreo el aporte de energía en promedio alcanza para una producción de entre 17 y 25 kg por día por vaca y Doyle *et al.* (2001), reportaron que la producción de leche a pastoreo es menor a 30 kg por día por vaca debido a las variaciones estacionales, a las características nutritivas y de crecimiento de las pasturas.

Bargo *et al.* (2002a) reportan que vacas que consumen pastura con una alta asignación (48,9 kg MS/vaca/d), produjeron 3,1 kg/d de leche más que las vacas que consumieron pastura con una asignación baja (26,7 kg MS/vaca/d), alcanzando producciones de 22,2 y 19,1 kg/d de leche respectivamente.

Finalmente en un meta-análisis realizado por Pérez-Prieto y Delagarde (2013), donde se analizan los efectos de la asignación de pastura sobre diferentes parámetros productivos de vacas lecheras consumiendo pasturas templadas, los autores revisaron 56 trabajos que incluían 97 asignaciones diferentes de pastura y reportan consumos de pastura en promedio de 14,6 kg MS/d (6,6 y 24,0 kg MS/d; mínimo y máximo respectivamente) y producciones de leche promedio de 18,6 kg/d (7,3 y 32,0 kg/d; mínimo y máximo respectivamente). A partir de los datos analizados concluyen que existe una fuerte relación entre la asignación de pasturas y el consumo de MS y la producción de leche,

aumentando estos parámetros a tasas decrecientes con el aumento del nivel de asignación de pastura (kg/vaca/d).

4.2.2 Producción de leche en base a pasturas y suplementación con concentrados.

El objetivo principal de la administración de suplementos a vacas lecheras en pastoreo es aumentar la ingesta total de MS y energía en relación con la que se consigue con las dietas exclusivamente pastoriles (Stockdale, 2000a). La suplementación con concentrados en vacas lecheras consumiendo pastura ha demostrado ser capaz de aumentar la producción de leche, siendo en general la respuesta de producción de leche a la suplementación con concentrado, en vacas de alta producción, de 1 kg de leche/ kg de concentrado suministrado (Leaver, 1985; Bargo *et al.*, 2003).

Este aumento de la producción está explicado por el aumento en el consumo de MS total cuando un animal consumiendo pastura es suplementado con concentrado (Bargo *et al.*, 2002a); sin embargo, la suplementación de pasturas templadas con concentrados en base a granos normalmente provoca una disminución del consumo de forraje (Bargo *et al.*, 2002a; Bargo *et al.*, 2003), efecto conocido como tasa de sustitución, entendida como la reducción en los kg de MS de pastura consumida por kg de suplemento (Van Vuuren *et al.*, 2006).

Bargo *et al.* (2003) en una revisión de una serie de trabajos experimentales que estudiaron dietas en base a pasturas y en base a pasturas más suplementación con concentrados, reportan que la producción de leche aumentó en promedio 4,4 kg/d (rango de 0,8 a 10,6 kg/d) con una suplementación del 22% comparado con una dieta exclusivamente pastoril. Con respecto a la producción de grasa, los autores observaron que en la mayoría de los estudios revisados hubo un descenso en el porcentaje de la grasa en la leche de aproximadamente 0,24% (solo en 4 trabajos no encontraron diferencias) y el descenso es del 6% cuando se compara con las dietas a base de pasto exclusivamente; sin embargo, numéricamente la producción de grasa aumentó (kg/d) aproximadamente un 13%. Asimismo, el porcentaje de proteína aumentó un 4% cuando se suplementa con concentrados respecto de una dieta exclusivamente pastoril, así como también se incrementó la producción de proteína en 0,17 kg/d, aproximadamente un 30% en las dietas suplementadas con concentradas vs solo pastura.

Los sistemas lecheros de la región utilizan dietas mixtas que combinan el pastoreo directo con el uso de suplementación de concentrados y/o forrajes conservados en diferentes proporciones pero suministrados separadamente; sin embargo esta forma de suministro de los concentrados no ha demostrado que sea capaz de optimizar las potencialidades de ambos alimentos (pastura y concentrado) (Cajarville *et al.*, 2012). Por lo tanto, cómo elegir e implementar el sistema y la manera de suministrar los alimentos de la forma más eficiente es un complejo desafío para productores y técnicos (Wales *et al.*, 2013).

En este sentido, en los últimos años se ha comenzado a utilizar en los sistemas lecheros de la región las RTM como sistema de alimentación, ya sea como único alimento o como suplemento de pasturas.

Las RTM son un sistema de alimentación donde los alimentos concentrados y forrajes son ofrecidos a los animales completamente mezclados en una única ración. A partir de la década de 1960 se comienza a utilizar RTM en la alimentación de vacas lecheras en

países del Hemisferio Norte, principalmente en EEUU y algunos países de Europa. Esta mezcla de distintos ingredientes en una única ración presenta varias ventajas entre las que se destaca la posibilidad de ofrecer una dieta con un aporte balanceado de nutrientes y una óptima relación forraje – concentrado, disminuyendo la posibilidad de selección de los componentes individuales de la ración. Asimismo, esto determina una formulación de la dieta más precisa que cuando se ofrecen los ingredientes individualmente (Gill, 1979; Coppock *et al.*, 1981).

Cuando se suplementa una pastura con una RTM, el sistema de alimentación es denominado por algunos autores como ración parcialmente mezclada (**RPM**) ya que la pastura que consumen no es parte integral de la RTM (Bargo *et al.*, 2002b). La utilización de este sistema RPM representa una alternativa que ha cobrado un creciente interés en su utilización y estudio, a pesar de que hasta el momento ha sido poco estudiada. La suplementación de pasturas con RTM podría ayudar a tener buenos niveles de producción de leche y sólidos (García & Fulkerson 2005), capitalizando los beneficios de una RTM y manteniendo las ventajas de la alimentación pastoril en cuanto a costos de producción (Wales *et al.*, 2013) y calidad del producto final (Morales-Almaráz *et al.*, 2010).

4.2.3 Efectos de la dieta sobre síntesis de la grasa láctea.

Los ácidos grasos encontrados en la leche provienen principalmente de 4 orígenes: directamente de la dieta, sintetizados de novo en la glándula mamaria, formación a nivel ruminal por biohidrogenización en los procesos de degradación bacteriana y los provenientes de la movilización de las reservas corporales (Chilliard *et al.*, 2000b)

La mayor parte de los lípidos ingeridos sufre los procesos de degradación por parte de los microorganismos ruminales (Bauman y Griinari, 2001), dando por resultado un pool de AG libres, en su mayoría insaturados, los cuales en primer instancia se isomerizan y luego sufren un proceso de hidrogenación dando por resultado final AG saturados (Chilliard *et al.*, 2000b) .

Aunque parte de los ácidos linoleico (C18:2) y linolénico (C18:3) escapan a estos procesos ruminales y llegan a la leche sin sufrir modificaciones, el 90% del linolénico y el 80% del linoleico sufren el proceso de hidrogenación, siendo el producto final el ácido esteárico (C18:0). En este proceso de saturación de los AG, se forman productos intermediarios como son los ácidos linoleicos conjugados (CLA), los cuales aparecen en la leche y en los productos derivados, confiriéndole a estos alimentos características benéficas para la salud del consumidor (Chilliard *et al.*, 2000b).

El principal CLA producido y presente en la grasa láctea, es el ácido ruménico (C18:2 cis-9, trans-1) el cual su presencia en la leche reconoce 2 orígenes: a) la absorción intestinal y transferencia a la glándula mamaria del ácido ruménico producido en el rumen y b) la síntesis a nivel de glándula mamaria a partir del ácido vaccénico (C18:1 trans-11) por acción de la enzima delta-9 desaturasa. Esta última vía explicaría la presencia del 64% del CLA en la leche (Griinari y Bauman 1999).

Tanto el ácido linoleico como el linolénico son los principales ácidos grasos poliinsaturados presentes en las dietas de los rumiantes. El linoleico presente en mayor medida en los silajes de maíz, cereales y en granos de oleaginosas como girasol y la

soja, en tanto que el linolénico es característica su mayor presencia en las pasturas (Chilliard et al., 2000b)

En los últimos años, ha habido un esfuerzo para determinar cómo maximizar los niveles de CLA en alimentos para humanos de productos derivados de los rumiantes (Bargo et al., 2006), teniendo en cuenta que investigaciones recientes reportan que a través de la manipulación dietética se puede alterar el contenido de CLA hasta cinco veces (Bauman et al., 2001, Chilliard et al., 2000b).

Está claramente establecido que vacas alimentadas con pastura generalmente tienen mayores concentraciones de CLA de leche, específicamente mayor concentración de ruménico, que las vacas alimentadas con raciones mixtas totales (White et al., 2001; Schroeder et al., 2003). Sin embargo, es limitada la información sobre cuáles son los efectos cuando se alimentan vacas con raciones parcialmente mezcladas.

4.2.4 Combinación de pastura y ración totalmente mezclada: Efectos sobre la producción y composición de la leche de vacas lecheras

Existe en la literatura diversos experimentos que han comparado estos dos sistemas (RTM y pastura) para alimentar vacas lecheras (por ejemplo: Kolver y Muller, 1998; Soriano et al., 2001; Tucker et al., 2001; Fontaneli et al., 2005; Schroeder et al., 2005; Mendoza et al., 2016). Tomados en conjunto, estos estudios reportan que cuando se pasa de un sistema de tipo RTM a uno pastoril, este cambio va acompañado de una reducción en la producción de los animales que oscila entre 20 y 30%, aunque otros autores reportan, a partir de encuestas a productores en EEUU, que dicha reducción varía entre 3 y 5% (Hanson et al., 1998). Según Kolver y Muller (1998), cuando se compara sistemas donde las vacas son alimentadas con pastura vs alimentadas con RTM, la menor producción en los animales alimentados con pastura se debe en un 61% a un menor consumo de MS, 24% al costo de búsqueda y cosecha de pastura, y 12% al costo de excreción del exceso de urea formada en vacas a pastoreo. Asimismo estos autores señalaron que las diferencias en el consumo de MS, más que la concentración energética de la pastura, aparece como el factor más importante que determina el consumo de energía en los animales consumiendo pastura de buena calidad como único alimento.

En el trabajo de Bargo et al. (2002b) se observó que las vacas alimentadas con RTM tuvieron la mayor producción de leche, grasa y proteína, asociado a un mayor consumo de energía, y las del tratamiento pastura + concentrado la menor, siendo el tratamiento pastura + RTM intermedio. Sin embargo, la concentración de ácido ruménico y vaccénico en la grasa láctea aumentó a mayor proporción de pastura en la dieta (pastura + concentrado > pastura + RTM > RTM) (Bargo et al., 2006). En este sentido, Kolver y Muller (1998) reportan que la producción de leche de vacas alimentadas con RTM fue de 44,1 kg/d/vaca vs 29,6 kg/d/vaca en vacas alimentadas con pastura, y que la producción de grasa y proteína también fue menor (kg/d) en las vacas alimentadas con pastura.

En el experimento realizado por Vibart et al. (2008) citado anteriormente, los autores reportan que el aumento en la proporción de raigrás anual en estado vegetativo en una dieta RTM de 21 a 41% (base seca) no afectó la producción de vacas lecheras, aunque con la misma pastura pero en un estado más avanzado de madurez, el aumento de la proporción de pastura de 11 a 35% (base seca) redujo la producción de leche y proteína.

En ambos casos, la concentración de ácido ruménico aumentó y disminuyó la cantidad de ácidos grasos saturados, a medida que aumentó el nivel de inclusión de pastura, lo que implica una mejora en la calidad del producto final.

Tanto en el trabajo realizado por Morales-Almaráz *et al.* (2010) como en el realizado por Soriano *et al.* (2001), donde compararon sistemas de alimentación de dietas RTM vs RTM + sesiones de pastoreo, reportan que cuando la pastura significa entre el 21 y 37% del total de la MS consumida la producción de leche, grasa y proteína no se ven afectadas. En este sentido, Mendoza *et al.* (2016) reportan que vacas consumiendo RTM + sesiones de 0 (RTM0), 4 (RTM4) y 8 h (RTM8) de FF, no tuvieron diferencias en producción entre RTM0 y RTM4; sin embargo, observaron una menor producción de leche en RTM8 vs RTM0 y RTM4 (32,7 vs. 34,4 kg/día respectivamente), así como de proteína (1,06 vs. 1,13 kg/día).

A pesar de que la progresiva inclusión de pasturas en la dieta de las vacas lecheras puede afectar la producción de leche y sus componentes, los trabajos disponibles en la literatura coinciden en señalar que esto podría redundar en una mejora en la calidad del producto final, específicamente a través de una mayor proporción de ácidos grasos insaturados (**AGI**) (tanto mono como poli-insaturados) y mayor cantidad de ácido ruménico presente en la grasa láctea (White *et al.*, 2001; Schroeder *et al.*, 2003; Schroeder *et al.*, 2005; Bargo *et al.*, 2006; Morales-Almaráz *et al.*, 2010).

4.3 Metabolismo, utilización del nitrógeno y síntesis de proteína microbiana en vacas lecheras.

Cuando el rumiante consume forrajes provenientes de pasturas templadas, ya sean praderas mezcla de gramíneas y leguminosas o verdeos, ingiere cantidades importantes de N (Nápoli y Santini, 1988ab; Khalili y Sairanen, 2000; Repetto *et al.*, 2001; Cajarville *et al.*, 2006) de rápida degradación ruminal (Cohen, 2001; Repetto *et al.*, 2005), generando elevadas concentraciones instantáneas de amoníaco (**N-NH₃**) (Khalili y Sairanen 2000; Cajarville *et al.*, 2006). Una proporción altamente variable es incorporada por las células microbianas del rumen, pero el N-NH₃ que no es incorporado en los compuestos nitrogenados bacterianos en gran parte es absorbido por el epitelio ruminal ingresando a la circulación portal transformándose en urea en el hígado (Kozloski, 2011). La urea es entonces la forma primaria de excreción de N en los rumiantes. Una parte de esta urea así producida, aproximadamente el 33%, es excretada por la orina y el 67% restante retorna al retículo-rumen con la saliva y/o por difusión directa trans-epitelial, a partir de la sangre que irriga la pared de los pre-estómagos (Kozloski, 2011; Bach *et al.*, 2005).

La producción hepática de urea ha sido directamente relacionada con el consumo de N digestible en algunos estudios, mientras que en otros existió una baja correlación entre estas variables. De este modo, los factores dietéticos que resultan en aumento de la absorción de amonio y/o aminoácidos, o que resultan en un bajo consumo de energía metabolizable, así como todos los factores relacionados al animal que determinan una alta demanda por energía y/o una baja demanda por aminoácidos para la síntesis proteica, tienen como consecuencia un aumento en la producción de urea por el hígado (Kozloski, 2011).

La urea producida a nivel hepático se equilibra rápidamente a través de los fluidos corporales, incluyendo la leche, y la concentración de N-Urea en leche (**MUN**) se

considera que refleja la concentración de N-Urea en sangre (**BUN**) ya que presentan una alta correlación (Roseler *et al.* 1993). Para realizar el monitoreo de la eficiencia de utilización de N en vacas en lactación se podría utilizar los valores de MUN (Baker *et al.*, 1995; Oltner and Wiktorsson, 1983; Roseler *et al.* 1993). Poder realizar este monitoreo de la eficiencia de utilización del N a partir de los niveles de MUN, es un método relativamente sencillo y sería muy importante ya que: 1) el consumo de un exceso de proteína bruta (**PB**) incrementa las necesidades de energía por 13,3 kcal de energía digestible (**ED**)/g de exceso de N (NRC, 1989); 2) los suplementos proteicos son los ingredientes de los alimentos más costosos; y 3) el exceso de excreción de N tiene un impacto ambiental negativo (Broderick *et al.*, 1997).

Adicionalmente, la eficiencia de transferencia de N a leche, que ya es baja en vacas alimentadas con RTM, es aún menor cuando son alimentadas con pasturas templadas de alta calidad, probablemente debido a la alta concentración de proteína soluble en las mismas, y a una posible falta de sincronización entre el aporte de N y carbohidratos para la síntesis microbiana a nivel de rumen (Hoekstra *et al.*, 2007).

La proteína microbiana que se sintetiza en el rumen representa entre el 50 al 80% de la proteína total absorbida, siendo de este modo la principal fuente de aminoácidos que llega al duodeno (Nocek y Russell, 1988; Bach *et al.*, 2005). Para una óptima síntesis de proteína microbiana a nivel ruminal es necesario lograr un equilibrio a través de la sincronización de los carbohidratos y la proteína en el rumen (Hoekstra *et al.*, 2007). La disponibilidad de nutrientes y la eficiencia que tengan los microorganismos ruminales para utilizarlos, representan los factores más importantes que determinan la síntesis de proteína microbiana en el rumen (Clark *et al.* 1992; Bach *et al.* 2005). Esto implica la optimización tanto en cantidades de carbohidratos y proteínas disponibles, así como también en sus respectivas tasas de degradación a nivel ruminal (Hoekstra *et al.*, 2007).

El suministro de fuentes proteicas y energéticas con similares tasas de degradación ruminal determinarían que la oferta de los nutrientes necesarios para síntesis de proteína microbiana se diera de forma simultánea, evitándose de esta manera ineficiencias en su utilización en el medio ruminal y una mayor eficiencia de síntesis de proteína microbiana (**ESPM**) (Nocek y Russell, 1998; Herrera-Saldana *et al.*, 1990). Sin embargo, algunos autores cuestionan esta teoría, planteando que el ecosistema ruminal es complejo y cuando los nutrientes para la síntesis de una especie microbiana están en sincronía, no lo están para otra, de forma tal que la ESPM permanecería incambiada (Bach *et al.*, 2005). Adicionalmente, cuando la fuente de N no es sincrónica con la de energía, el N reciclado que retorna al rumen puede contribuir a estabilizar los niveles de N y el crecimiento microbiano en rumen (Bach *et al.* 2005; Hall and Huntington, 2008).

En sistemas donde la alimentación es de base pastoril, la manipulación de la composición nutricional de la pastura en pastoreo es más difícil comparado con animales en condiciones de estabulación donde se utilizan otros sistemas de alimentación, como las RTM, y por lo tanto sería más difícil lograr una adecuada sincronización entre los nutrientes que son sustratos para la síntesis de proteína microbiana (Hoekstra *et al.*, 2007).

4.3.1 Combinación de Pastura y ración totalmente mezclada: Efectos sobre la eficiencia de utilización del N de vacas lecheras y la síntesis de proteína microbiana

Son pocos los trabajos que han experimentado en alimentación de vacas lecheras con dietas que combinen pastura y RTM, y que han determinado o reportado resultados sobre eficiencia de utilización del N, MUN o BUN, y solamente Bargo *et al.* (2002b), y Vibart *et al.* (2010) en un trabajo *in vitro*, reportan efectos sobre la síntesis de proteína microbiana a nivel ruminal.

Bargo *et al.* (2002b) reportan que vacas alimentadas con RTM y RPM tuvieron una menor concentración de BUN que las alimentadas con PC (pastura + concentrado), y las vacas alimentadas con RTM tuvieron una menor concentración de MUN que en RPM, que a su vez fue menor que en PC; esto sugiere un mayor aprovechamiento del N ingerido en las vacas alimentadas con RTM. Similares resultados obtuvieron Vibart *et al.* (2008) en un trabajo que consistió en 2 experimentos, al comparar en vacas lecheras, dietas 100% RTM y tres dietas con diferentes proporciones de RTM y pastura de alta calidad; los autores observaron que a medida que aumenta la proporción de pastura en la dieta, mayor es la concentración de MUN y BUN, cuando la pastura se encuentra en estado vegetativo. Sin embargo, cuando la pastura presenta una calidad inferior, cuanto mayor es el nivel de inclusión de pastura, menores son las concentraciones de MUN y BUN. En el mismo sentido, Kolver y Muller (1998) reportan que la concentración de BUN es mayor para vacas alimentadas con una dieta en base a pastura con respecto a las que son alimentadas solo con RTM. Sin embargo, White *et al.* (2001), en un estudio donde comparan dos sistemas de alimentación (RTM y Pastura) y dos razas (Holando y Jersey), reportan no haber encontrado diferencias en los valores de MUN. Del mismo modo, Mendoza *et al.* (2016) tampoco encontraron diferencias para las concentraciones de MUN ni de BUN entre vacas alimentadas exclusivamente RTM respecto a las que combinaban RTM + sesiones de acceso a FF durante 4 u 8 h.

Con respecto a la síntesis de proteína microbiana, Vibart *et al.* (2010) en un trabajo realizado *in vitro* en un sistema de rúmenes artificiales de flujo continuo, comparó los 4 tratamientos alimentarios utilizados en el trabajo de Vibart *et al.* (2008): 1) 100% RTM, 2) 85:15 RTM:Pastura, 3) 70:30 RTM:pastura y 4) 55:45 RTM:pastura. Estos autores observaron que tanto la concentración de N proveniente de células microbianas como la cantidad de células microbianas aumentan cuando la proporción de pastura en la dieta aumenta. También *in vitro*, Soder *et al.* (2013), realizaron un trabajo en el cual evaluaron los efectos de los siguientes tratamientos: 1) 100% Pastura (*Dactylis glomerata*), 2) 100% RTM, 3) 50% pastura y 50% RTM y 4) 90% pastura y 10% semilla de linaza. Estos autores no observaron diferencias en el flujo de N microbiano entre los diferentes tratamientos al igual que Bargo *et al.* (2002b), quien utilizó la relación alantoína/creatinina como indicador de síntesis de proteína microbiana a nivel ruminal.

4.4 Metabolismo de la Glucosa e insulina en vacas lecheras.

La glucosa constituye la fuente principal de energía para los diferentes tejidos del organismo y es particularmente importante para el sistema nervioso (Relling y Mattioli, 2003). En los rumiantes los niveles sanguíneos de glucosa dependen fundamentalmente de la neoglucogénesis hepática a partir de precursores como el propionato, aminoácidos, glicerol y lactato, pudiendo contribuir de manera importante la digestión y absorción intestinal del almidón (Huntington *et al.*, 2006), siendo muy limitada la cantidad de glucosa que llega al intestino y logra ser absorbida (del 5 al 15%), ya que la mayor parte de los carbohidratos ingeridos son convertidos a AGV a nivel ruminal (Brockman y Laarveld, 1986). Para lograr mantener los niveles de glucosa en sangre constantes, en el

rumiante la neoglucogénesis a nivel hepático está regulada por una interacción de mecanismos mediados por efectos alostéricos, hormonales de corto plazo y procesos de inducción o represión enzimática (Drackley *et al.* 2001).

La tasa de conversión de propionato a glucosa en animales consumiendo dietas altas en forraje es menor que en aquellos consumiendo dietas ricas en concentrados, siendo el aporte de los aminoácidos a la formación de glucosa dependiente de la oferta hepática de aminoácidos, estando esta fuente de glucosa, correlacionada positivamente con el consumo de proteína en la dieta (Drackley *et al.* 2001). El glicerol se puede transformar en un precursor de importancia en situaciones donde exista una alta tasa de movilización de reservas grasas (Drackley *et al.*, 2001; Huntington *et al.*, 2006). En términos cuantitativos, en los rumiantes, del total de la glucosa formada a nivel hepático el propionato es el principal precursor neoglucogénico aportando entre el 55 y 70%, mientras que los aminoácidos como alanina, glutamina, cisteína, glicina, serina y treonina podrían llegar a aportar entre un 15 y 20% de la glucosa. Otras fuentes para la síntesis de glucosa hepática lo constituyen el glicerol y el lactato, pudiendo sintetizar del 5 al 15% de la glucosa producida en el hígado (Relling y Mattioli, 2003).

En rumiantes el nivel y la homeostasis de la glucosa en sangre está regulado principalmente por 2 hormonas: insulina y glucagón (Drackley *et al.* 2001). La insulina estimula la captación de glucosa por parte de los tejidos, la síntesis de glucógeno, la glicólisis y la síntesis de ácidos grasos a nivel hepático, estimulando el anabolismo principalmente a nivel de tejido muscular y adiposo, siendo el principal regulador de la disposición de los nutrientes a nivel del organismo (Brockman y Laarveld, 1986). A pesar de que la insulina disminuye la neoglucogénesis hepática, ya que disminuye la síntesis de glucosa vía piruvato, ésta no altera la conversión de glucosa vía propionato (Drackley *et al.* 2001, Huntington *et al.* 2006). El glucagón estimula la liberación de glucosa a la sangre y estimula directamente la conversión de propionato en glucosa así como el uso de aminoácidos para la neoglucogénesis (Drackley *et al.*, 2001).

La glucosa es el principal sustrato que requiere la glándula mamaria de los bovinos para la producción de leche, alcanzando hasta el 80% del total de la glucosa producida a nivel hepático, pudiendo ser incluso mayor en animales de alta producción por lo que la tasa de síntesis a nivel hepático puede verse incrementada (Bell y Bauman, 1997, Emery *et al.*, 1992). Esta glucosa es utilizada como fuente de energía y como precursor de la síntesis de lactosa (70 a 80%) en la propia glándula mamaria (Relling y Mattioli, 2003).

4.4.1 Combinación de Pastura y ración totalmente mezclada: Efectos sobre los valores sanguíneos de glucosa e insulina.

En la literatura consultada son varios los trabajos realizados en alimentación de vaca lechera que comparan ambos sistemas de alimentación y que reportan valores de glucosa en sangre, pero son pocos los que reportan valores de insulina.

En el trabajo de Bargo *et al.* (2002b) se reporta que en vacas alimentadas con RTM vs RPM y PC (pastura + concentrado), la concentración de glucosa en sangre no fue afectada por los tratamientos siendo el promedio 64,8 mg/dl. Los resultados obtenidos por Kolver y Muller (1998) cuando comparan tratamiento RTM vs pastura tampoco muestran diferencias de valores sanguíneos de glucosa, reportando valores de 63,1 y 61,7 mg/dl respectivamente. En los trabajos de Schroeder *et al.* (2003) y Schroeder *et al.* (2005), donde se comparan los valores plasmáticos de glucosa en vacas alimentadas

con RTM vs Pastura + maíz vs Pastura + maíz + grasa en el primer trabajo, y RTM vs pastoreo de Avena en el segundo, tampoco encuentran diferencias significativas en la glucosa sanguínea reportando valores entre 66,2 y 70,6 mg/dl en el primer trabajo y valores de 57,2 para el pastoreo de avena y 53,6 para RTM en el segundo trabajo.

Por otro lado, Delany *et al.* (2010) en un trabajo donde comparó animales consumiendo una RTM con animales alimentados con pastura + grano, reportan que los animales que consumieron RTM tuvieron mayores valores sanguíneos de glucosa que los alimentados con pastura + grano (66,7 vs 59,4 mg/dl). Asimismo, Vibart *et al.* (2008), en un trabajo que consistió en comparar dietas 100% RTM y tres dietas con diferentes proporciones de RTM y pastura de alta calidad, observaron que a medida que aumenta la proporción de pastura en la dieta la concentración de glucosa en sangre decrece, siendo el mayor valor de 61,5 mg/dl para RTM y el menor valor de 57,7 mg/dl cuando la relación RTM:Pastura es de 65:35. En el trabajo realizado por Mendoza *et al.* (2012), donde compararon vacas alimentadas exclusivamente RTM con vacas que combinaban RTM + sesiones de acceso a FF durante 4 u 8 h, solo observaron diferencias en los valores de glucosa sanguínea cuando se comparó el tratamiento que consumió exclusivamente RTM (78,1 mg/dl) vs RTM + 8 hs de acceso a FF (74,2 mg/dl).

Con respecto a los valores de insulina plasmática, Delany *et al.* (2010) en el trabajo citado anteriormente reporta que los valores de insulina fueron mayores para los animales que consumieron RTM cuando se los compara con los que consumieron pastura + grano (480 vs 131 pg/ml). Resultados similares reportan Mendoza *et al.* (2012), donde los valores de insulina en el tratamiento que consumieron exclusivamente RTM fue mayor que cuando tuvieron acceso a FF durante 8 h (28,2 vs 23,2 μ UI/ml respectivamente), y no reportan diferencias entre los restantes tratamientos.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En las últimas décadas la producción de leche en Uruguay ha crecido a un ritmo constante y sostenido, alcanzando a 2.314 millones de litros producidos en el año 2013, siendo este, un record histórico de litros producidos, lo que representó un aumento a una tasa anual del 5% (DIEA, 2016). Este crecimiento se produce por un aumento de la productividad y esta se explica por el incremento en el número de vacas por unidad de superficie (stock de vaca masa se incrementó un 23%), así como por el incremento de producción individual por vaca, ya que el número de explotaciones lecheras descendió un 25% (de 6000 a 4341 productores) y la superficie destinada a la lechería disminuyó un 28% (de 1.058.000 há a 795.000 há) en el mismo período (DIEA, 2016). A su vez este aumento en la productividad se explica en gran medida en el importante cambio en el manejo de la alimentación en los rodeos. En el año 2003, la composición media de la dieta de las vacas lecheras en Uruguay suponía un consumo de 30% de concentrados y reservas y aproximadamente 70 % de forrajes por pastoreo directo. En el año 2011 la dieta de los tambos con mayores ingresos de capital muestra un cambio sustancial, representando el consumo de concentrados y reservas (suministrados como mezcla o en forma separada) aproximadamente un 60% de la dieta, mientras que el forraje obtenido por pastoreo directo solamente el 40% (Repetto, 2011). En información presentada por el equipo técnico de Conaprole se observa que las pasturas ocupan aproximadamente el 47% de la MS consumida por las vacas lecheras, el 28% a concentrados y el 25% restante a reservas forrajeras, logrando un consumo de MS anual por animal que asciende a los 6520 kg (Chilibroste & Battezzato, 2014).

A nivel internacional también existe una tendencia a la intensificación de los sistemas. En este sentido, un trabajo realizado por Eastridge (2006) que consistió en una síntesis de 25 años de estudios publicados en el Journal of Dairy Science, el autor reporta que en este período se ha incrementado fuertemente la producción individual por vaca, lo que ha significado por consiguiente un aumento en los requerimientos por parte de los animales, lo que no ha sido acompañado por un aumento en la capacidad de consumo de los alimentos comúnmente suministrados. Para lograr compensar este desfase entre requerimientos y consumo, ha sido necesario concentrar los nutrientes en las dietas, y por parte de los investigadores se ha comenzado la búsqueda de alternativas que permitan mejorar la eficiencia de conversión y la salud de los animales a través de mejoras principalmente en la calidad de alimentos, la digestibilidad de la dieta y de eficiencia en la fermentación ruminal.

La producción lechera a nivel local ha debido sostener una fuerte competencia por el recurso suelo con otros rubros productivos como la agricultura de secano y la forestación, las cuales han crecido paralelamente a la lechería (DIEA, 2013), lo que explica la disminución de área lechera total mencionada anteriormente. A pesar de esta fuerte competencia, la expansión de la agricultura brinda la oportunidad a los productores lecheros de contar con granos y/o subproductos para la suplementación o elaboración de dietas concentradas para la alimentación de los rodeos, aunque debido a la creciente demanda mundial por los granos para la alimentación humana y a la fabricación de biocombustibles, estos no disminuirán sus costos. Por lo tanto sería importante determinar cuál estrategia de alimentación sería la adecuada para optimizar la eficiencia de conversión de estos alimentos a leche (Doyle *et al*, 2001; Beever y Doyle, 2007).

En este sentido, la principal limitante para la producción de leche en sistemas a base de pasturas son los patrones estacionales de crecimiento y los cambios en las características nutricionales de las pasturas (Doyle *et al.*, 2001). Esto genera desbalances entre la oferta y la demanda de nutrientes, el cual se corrige a través de la utilización de suplementación, ya sea con reservas forrajeras y/o con concentrados (Chilibroste *et al.*, 2012). Asimismo, los sistemas lecheros de la región utilizan sistemas de alimentación en base a dietas mixtas que combinan el pastoreo directo con el uso de concentrados y/o reservas forrajeras en diferentes proporciones y suministrados separadamente. Esta forma de suministro de los concentrados no ha demostrado que sea capaz de optimizar la potencialidad de ambos alimentos (pastura y concentrado) (Cajarville *et al.* 2012). Del mismo modo, se ha observado que la eficiencia de síntesis de proteína microbiana y el ambiente ruminal no se han visto favorecidos al suplementar pasturas de alta calidad con concentrados (Aguerre *et al.*, 2009; Tebot *et al.*, 2012) cuando se compara con animales consumiendo solo pastura.

Una RPM correctamente formulada puede producir una fermentación ruminal más estable y con menos variaciones de pH que cuando el grano es suministrado en la sala de ordeño (Wales *et al.*, 2013). Por lo tanto, el suministro de una RTM utilizada como suplemento de pastoreo podría mejorar la producción de leche en comparación con los concentrados cuando son suministrados en forma separada (Beever y Doyle, 2007).

Diversos trabajos que comparan ambos sistemas de alimentación (pastoril y en base a una RTM) reportan una disminución en el desempeño animal, que es explicado principalmente por la disminución en el consumo. En una de revisión bibliográfica realizada por García and Fulkerson (2005), donde se analizan varios experimentos que trabajaron en dietas que combinan pastura y RTM, observaron que cuando la pastura ocupa entre el 20 y 40% del total de la MS consumida la disminución en producción es menos acusada o inexistente. En este sentido, en un relevamiento en EEUU de tambos que utilizaban sistemas de alimentación mixtos realizado por Soder y Muller (2007), observaron que en promedio, el 25% del consumo total de MS provenía de la pastura (con un rango de 9 a 36%).

Finalmente, en un trabajo realizado previamente por el equipo de investigación donde se estudió el efecto del tiempo de acceso a un FF en vacas alimentadas con una RTM sobre los parámetros productivos y de aprovechamiento digestivo y metabólico de vacas lecheras de alta producción, se reporta que la proporción de forraje en la dieta con la cual no se encontraron diferencias significativas con el tratamiento que consumía solo RTM fue aproximadamente 11%, lo que representa un consumo de 2,8 kg de MS proveniente de FF (Mendoza *et al.*, 2016). El nivel de consumo de FF logrado en este trabajo fue menor al esperado, lo que condujo al equipo de investigación a pensar en otro modelo de asignación de los distintos alimentos, ahora en términos del porcentaje del total de la MS ofertada, en lugar de asignar el FF por horas y así poder lograr niveles de consumo de pastura más cercanos al promedio utilizado en los sistemas de producción.

Este trabajo entonces, buscará contribuir en identificar cual es la combinación (o la proporción) de FF y RTM en la dieta de vacas lecheras, que logre maximizar la utilización de ambos alimentos de manera tal que permita que la producción y composición de la leche, la eficiencia de utilización de N y de energía y la síntesis de proteína microbiana a nivel ruminal sean iguales o mayores que cuando se utiliza exclusivamente una RTM.

6. HIPÓTESIS

Por encima de un 25% de la materia seca consumida, el progresivo aumento de raigrás en la dieta de vacas lecheras alimentadas con una dieta base de ración totalmente mezclada, provocará una disminución en el consumo de MS de los animales y esto traerá aparejado una disminución en la producción de leche y de sus componentes, así como en la eficiencia de utilización de los nutrientes. Sin embargo, se lograrán aumentos en el contenido de ácidos grasos considerados beneficiosos para la salud humana.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo general:

Evaluar el efecto de suministrar distintas combinaciones de forraje fresco de alta calidad y una ración completamente mezclada sobre el desempeño productivo y la eficiencia de utilización de los nutrientes de vacas lecheras de alta producción.

7.2 Objetivos específicos:

Evaluar el efecto de suministrar distintas combinaciones de un FF de alta calidad y una RTM en la dieta de vacas lecheras de alta producción sobre:

1. el consumo de MS y materia orgánica.
2. la utilización y balance del N, y el flujo de proteína microbiana al duodeno.
3. la producción y composición de la leche, incluyendo el perfil de ácidos grasos.
4. el metabolismo energético y nitrogenado.
5. la eficiencia de utilización de los nutrientes.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en el Campo Experimental N° 2 – Libertad, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República, ubicado en el km 42,200 de la ruta nacional N° 1, en la zona de Libertad en el Departamento de San José, Uruguay (34° S y 55° O), en las instalaciones de la Unidad de Metabolismo y Digestión Ruminal de los Departamentos de Nutrición Animal y Bovinos. Los análisis de composición química de los alimentos utilizados para las dietas se realizaron en el laboratorio del Departamento de Nutrición de la Facultad de Veterinaria, mientras que el contenido de grasa, proteína, urea y lactosa en leche, así como el perfil de ácidos grasos se realizaron en el laboratorio Colaveco y el análisis de caseína en leche se realizó en el laboratorio de calidad de leche del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria – La Estanzuela.

El trabajo con animales fue realizado de acuerdo con los reglamentos sobre el uso de animales en experimentación, enseñanza e investigación (Comisión Honoraria de Experimentación Animal (C.H.E.A), UdelaR, Uruguay), y en el marco del protocolo de investigación aprobado por la Comisión de Experimentación en el Uso de Animales (CEUA) PI 12/13 Exp. 111130-000818-13.

8.1 Diseño experimental

Se utilizaron 12 vacas multíparas Holando, seleccionadas entre las del rodeo del campo experimental, con 90 ± 22 días de lactancia (media $\pm$ desvío estándar (**DE**)) 523 ± 88 kg de peso vivo y 7908 ± 719 kg de leche de producción en la lactancia anterior. Los animales fueron agrupados en un diseño de cuadrado latino de 3x3 por cuadruplicado, los cuales fueron bloqueados en cada cuadrado según su peso vivo, producción al inicio del experimento, y producción en la lactancia previa; y dentro de cada cuadrado se asignaron al azar a los tres tratamientos: 1) RTM100: oferta *ad libitum* de una RTM. 2) RTM75: oferta equivalente al 75 % del consumo estimado de MS de la RTM utilizada en RTM100 + oferta de FF de alta calidad equivalente al 25% del consumo estimado de MS. 3) RTM50: oferta equivalente al 50 % del consumo estimado de MS de la RTM utilizada en RTM100 + oferta de FF de alta calidad equivalente al 50% del consumo estimado.

8.2 Manejo de los animales y alimentación

Los animales fueron alojados en bretes individuales donde tuvieron libre acceso a agua fresca. El FF utilizado fue Raigrás anual (*Lolium multiflorum*), cultivar LE 284, con una disponibilidad de 2500 kg de MS/ha en promedio para los tres períodos. La misma fue cortada diariamente a las 11:00 h para los dos tratamientos que la consumían, a 10 cm del suelo con una segadora de discos, y fue ofrecida en comederos individuales. El forraje se conservó fresco durante todo el día debido a las bajas temperaturas ambiente registradas durante el período de experimentación (temperatura promedio 9° C, INIA Las Brujas, entre junio y agosto de 2012), y el sobrante de cada día se desechó al día siguiente. La ingesta diaria comenzaba a la hora 08:00, siendo esta considerada como la hora 0 de referencia para los muestreos y mediciones.

La RTM100 fue formulada y balanceada de acuerdo a las recomendaciones del NRC (2001) para cubrir los requerimientos de una vaca de 600 kg de peso produciendo 35 L de leche / día. La composición química de la pastura, la RTM y los ingredientes con que

fue formulada la RTM, se presenta en el cuadro I, y los ingredientes de la RTM se presentan en el cuadro II. La cantidad de alimento se asignó a cada animal en función del consumo potencial individual, el que se determinó durante 10 días previos a la adaptación del primer periodo. Para el tratamiento RTM100 se ofreció RTM como único alimento y en el caso de los tratamientos RTM75 y RTM50, se ofreció el 75% y 50% del consumo potencial de la misma RTM que en RTM100, completando el 100% de la dieta con el 25% y 50% de FF respectivamente. El promedio de oferta fue de 30 kg de MS por animal de los cuales el 75% era RTM y el 25% de forraje fresco para RTM75 y 50% RTM y 50% de forraje fresco para RTM50.

La rutina de alimentación a los animales comenzaba a las 08:00 h (hora 0), coincidente con la salida del primer ordeño, y se le asignaba una primera sesión de RTM a los tres tratamientos por igual. El tratamiento RTM100 continuaba con acceso a RTM por el resto del día. Aproximadamente a la hora 2, ambos tratamientos que incluyen FF en la dieta pasaban a comer FF. Posteriormente hacia la hora 6 el tratamiento RTM75 retomaba el consumo de RTM hasta el final de la jornada, mientras que RTM50 retomaba el consumo de RTM aproximadamente a la hora 10 (18:00 h).

Cuadro I. Composición química¹ del forraje fresco (*Lolium multiflorum*), la RTM y de los alimentos utilizados para formular la RTM.

	Forraje fresco ²	RTM ³	EMPE ⁴	GHM ⁵	HS ⁶
MS ⁷ (%)	17,5 ± 5,2	38,1 ± 1,8	23,2 ± 1,5	78,4 ± 0,9	90,0 ± 0,1
<i>Composición (%MS)</i>					
MO ⁸	84,9 ± 1,2	92,7 ± 0,4	91,63 ± 0,8	98,3 ± 0,7	91,6 ± 0,2
PB ⁹	15,1 ± 2,7	18,0 ± 0,8	8,10 ± 0,1	9,5 ± 0,2	50,3 ± 1,1
FND ¹⁰	40,8 ± 4,8	41,1 ± 2,8	52,0 ± 2,1	8,5 ± 0,1	18,0 ± 0,4
FAD ¹¹	24,1 ± 2,4	24,6 ± 0,3	31,0 ± 0,9	2,2 ± 0,2	6,7 ± 0,1
CNF ¹²	26,3 ± 3,1	31,7 ± 3,2	29,3 ± 2,7	79,3 ± 0,9	21,3 ± 1,4
EE ¹³	2,7 ± 0,2	1,9 ± 0,1	2,2 ± 0,1	4,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1
AS ¹⁴	20,0 ± 0,7	4,2 ± 0,3			
NDIN ¹⁵	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	1,4 ± 0,1
NIDA ¹⁶	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0	1,7 ± 0,1
<i>Composición (Mcal/kg MS)</i>					
ENL ¹⁷	1,48 ± 0,1	1,70 ± 0,2			

¹Promedio de los 3 periodos; ²Forraje fresco, *Lolium multiflorum* Disponibilidad 2500 kg/MS/há promedio en los 3 periodos; ³Ración totalmente mezclada; ⁴Ensilaje de maíz planta entera; ⁵Grano húmedo de maíz; ⁶Harina de soja; ⁷Materia seca; ⁸Materia orgánica; ⁹Proteína bruta; ¹⁰Fibra neutro detergente; ¹¹Fibra ácido detergente; ¹²Carbohidratos no fibrosos, calculado como: %CNF = %MO – (%PB + %FND + %EE); ¹³Extracto al éter; ¹⁴Azúcares solubles; ¹⁵Nitrógeno insoluble en detergente neutro; ¹⁶Nitrógeno insoluble en detergente ácido; ¹⁷Energía neta de lactación (Mcal/kg), según NRC (2001).

Los animales fueron ordeñados dos veces por día (0700 y 1800 h) en el tambo y luego volvían a sus respectivos bretes donde seguían con los tratamientos asignados. Durante el ordeño no se les administró ningún tipo de alimento. La RTM se mezclaba diariamente y se ofrecía según el tratamiento, reponiendo a medida que los animales la consumían. Durante dos días consecutivos de cada período se determinó el peso de todas las vacas con una balanza electrónica.

Cuadro II. Ingredientes de la ración totalmente mezclada.

Ingredientes	% de la MS
Ensilaje de maíz planta entera	53
Grano húmedo de maíz	23
Harina de soja	22
Vitaminas ¹	0,01
Bicarbonato de sodio	0,60
Oxido de magnesio	0,20
Fosfato di-cálcico	0,40
Cloruro de sodio	0,20
Carbonato de Calcio	0,20
Monensina ²	0,01
Secuestrante	0,04
Levaduras ³	0,01

¹Rovimix® Lecheras, DSM Nutritional Products Ltd. Basilea, Suiza

²Rumensin® 100 Premix, Elanco Animal Health, Greenfield, EEUU

³Procreatin 7 ®, Elanco Animal Health, Greenfield, EEUU

Los cambios en las dietas correspondientes a cada tratamiento se realizaron progresivamente durante cada período de adaptación. Cada período experimental tuvo una duración de 22 días, consistiendo en 11 días de adaptación, seguido de 11 días de mediciones (Figura 1).

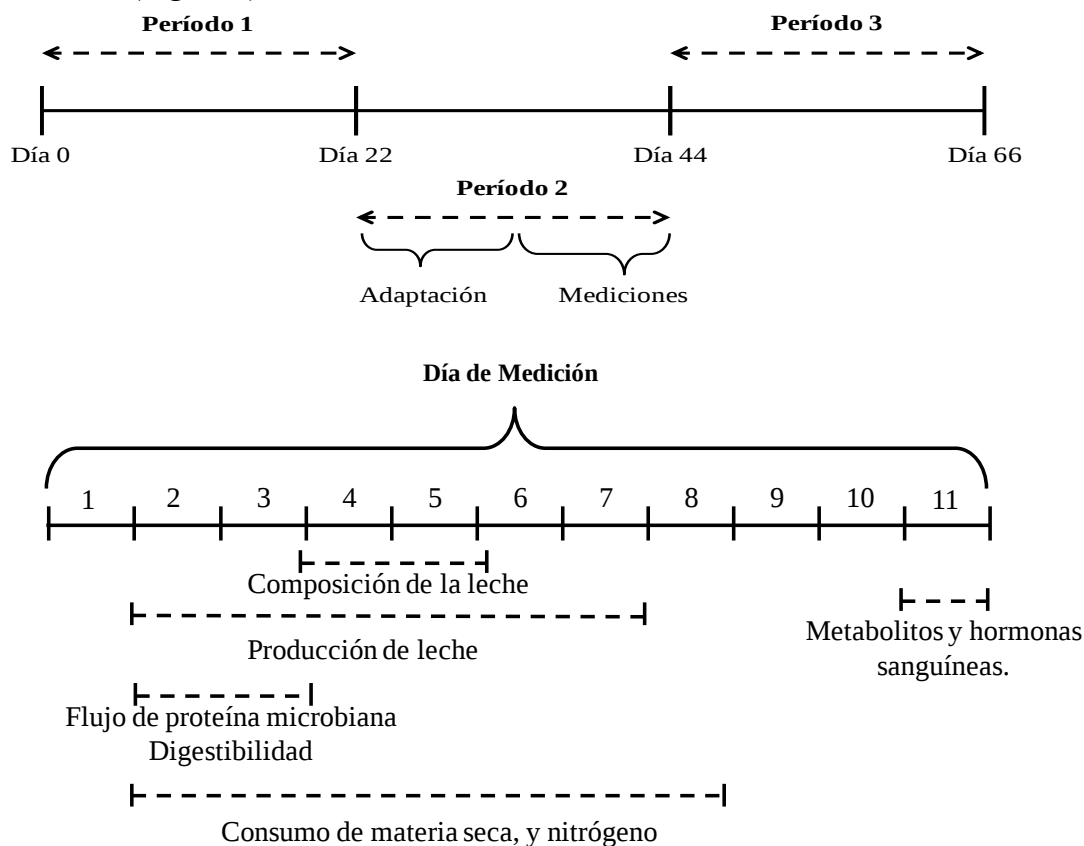


Figura 1. Esquema de las determinaciones experimentales.

8.3 Mediciones y cálculos:

8.3.1 Consumo de los nutrientes

A partir del día 2 hasta el día 8 de cada período de mediciones se determinó el consumo individual diario de alimentos tanto de la RTM como del FF, por diferencia de peso entre la cantidad total de alimento ofrecido y rechazado por animal. Se tomaron muestras diarias de los alimentos ofrecidos y rechazados, que posteriormente se congelaron a -18°C para su posterior análisis de composición química. A partir del análisis de composición química de los alimentos, se determinó el consumo de cada fracción de los alimentos (MS, MO, PB, FND y FAD). El consumo de MO digestible (**CMOD**) se calculó como el producto del consumo de MO y su porcentaje de digestibilidad, cuya determinación se describe en 8.3.2.

8.3.2 Digestibilidad de la materia seca y materia orgánica.

La digestibilidad se determinó de manera indirecta utilizando la fibra ácido detergente indigestible (**FADi**) como marcador interno (Huhtanen *et al.*, 1994) para estimar la cantidad diaria de materia fecal producida. Para ello se tomaron muestras de heces directamente del recto los días 2 y 3 de cada período experimental a las -6 y +6 horas (hora 0 = 0800 h), y posteriormente se congelaron a -20°C hasta su procesamiento. Luego de descongeladas, se secaron en estufa por 48 h a 56°C, posteriormente fueron molidas en molino eléctrico con una zaranda de 2 mm y posteriormente incubadas en bolsas de Dacron (5 x 10 cm, con poros de 50 micrones) en el rumen de 2 vacas secas con fistulas en rumen, alimentadas con una dieta compuesta por 70% de heno de alfalfa y 30% de concentrado comercial.

Se consideró FADi al contenido de FAD en el residuo no digerido tras incubación *in situ* de las bolsas por 12 días consecutivos. La producción de heces se calculó de la forma descrita por Merchen (1993) como:

$$\text{kg MS de Heces/día} = \frac{\text{CFADi (g/día)}}{\left[\text{FADi heces} \right] \text{ (g/kg MS)}}$$

donde CFAD_i es el consumo de FAD indigestible (g/d) y [FAD_i heces] es la concentración de FAD indigestible en las heces (g/kg MS).

La digestibilidad de MS y MO se determinaron a partir de los análisis de composición química, para lo cual se determinó la concentración de MS y cenizas en los alimentos y en las heces, según se describe más adelante. Los porcentajes de digestibilidad fueron calculados, para cada fracción del alimento como: (cantidad ingerida (g) - cantidad eliminada (g)) / cantidad ingerida (g).

8.3.3 Derivados púricos y flujo de N microbiano a duodeno

En los días 2 y 3 de cada período de mediciones se estimó el flujo de proteína microbiana a duodeno de forma indirecta, a partir de la determinación de la concentración de creatinina y la cuantificación de derivados de purinas en orina (Valadares *et al.* 1999). Cada día se tomaron dos muestras puntuales de orina de 15 ml, a las -6 y +6 horas (hora 0 = 0800 h), las cuales se diluyeron en 60 ml de una solución

de H₂SO₄ 0,072 N y posteriormente se congelaron a -20°C hasta su posterior análisis (Broderick *et al.*, 2009). Luego de descongelar las muestras a temperatura ambiente, se realizó un pool con cantidades iguales de cada una de las 4 muestras, de la cual se tomó la alícuota necesaria para la realización de las diferentes determinaciones.

La concentración de creatinina en orina se determinó por un método colorimétrico utilizando un kit comercial (Weiner Laboratorios S.A.I.C. 2000; Rosario, Argentina). La concentración mínima detectable fue 0,09 mg/L. El coeficiente de variación intraensayo para controles bajos (10 mg/L) y para controles altos (40 mg/L) fue de 4,7% y 0,9% respectivamente. Todas las muestras se analizaron por duplicados usando un espectrofotómetro (Unico 1200 series, United Products & Instruments, Inc, NJ, EE.UU.).

La determinación de ácido úrico y de alantoína en orina se realizó de acuerdo a lo descrito por Balcells *et al.* (1992) por el método de cromatografía líquida de alta performance (HPLC, Dionex Ultimate[®] 3000), utilizando una columna Acclaim C18 de 205 nm, 5 µm, 4,6 x 250 mm.

La excreción diaria total de derivados púricos (**DP**) (mmol/d) fue calculada como la relación entre la concentración (mmol/L) urinaria de DP y la excreción esperada de creatinina (mmol/d), la cual fue estimada asumiendo una tasa de excreción diaria de creatinina de 29 mg/kg de PV (Valadares *et al.*, 1999). La absorción total de purinas (**PA**) de origen microbiano fue calculada según la siguiente fórmula sugerida por Chen y Gomes (1992):

$$PA \text{ (mmol/d)} = (DP - 0,385 \times PV^{0,75})/0,85,$$

donde DP es la excreción diaria de derivados púricos, 0,385 es la excreción de DP endógena y 0,85 es la eficiencia de absorción de purinas.

La estimación del flujo de N de origen microbiano al duodeno (**FNM**) fue calculado de la forma sugerida por Chen y Gomes (1992) a excepción del factor 0,134 que fue tomado de Valadares *et al.* (1999):

$$FNM \text{ (g/d)} = (PA \times 70) / (0,134 \times 0,83 \times 1000),$$

donde PA es la absorción de purinas (mmol/d), 70 es el contenido de N de las purinas (mg de N/mmol), 0,134 es la relación entre N de las purinas/ N total y 0,83 es la digestibilidad asumida de las purinas de origen microbiano.

La eficiencia de flujo de N microbiano al duodeno fue calculada como: pasaje de N microbiano (g/d)/ consumo de MO digestible (kg/d) y la eficiencia de utilización del N para síntesis de N microbiano fue calculada como: pasaje de N microbiano (g/d)/ consumo total de N (g/d).

8.3.4 Balance de nitrógeno y eficiencia de uso de N para producción de leche

El balance de N se calculó como la diferencia entre la ingestión diaria de N (g/d), y la excreción diaria de N (g/d) en heces, orina y leche.

Para la determinación del N en orina, se determinó de manera indirecta el volumen de orina total diario, a través de la cuantificación de creatinina en orina, de la manera ya descrita para flujo de proteína microbiana según Valadares *et al.* (1999).

Para la determinación del N en heces, se estimó la producción total de heces diarias de manera indirecta utilizando la FADi como marcador interno (Huhtanen y *col.*, 1994) tal como fue descrito para la digestibilidad.

La determinación del N en orina, así como en las heces se realizó por método de Kjeldhal. Para la determinación del N secretado en leche, se tomaron las muestras de leche tal como se describe para la determinación de la composición de la leche, y la secreción diaria de N por leche se calculó como el cociente entre la cantidad diaria (g/d) de proteína secretada en leche y el factor 6,38 (NRC, 2001).

El valor biológico fue calculado de la forma sugerida por Bargo *et al.* (2002a) como el cociente entre $(N \text{ consumido} - (N \text{ heces} + N \text{ orina}))$ y $(N \text{ consumido} - N \text{ heces}) \times 100$.

8.3.5 Producción y composición de la leche

La producción de leche se determinó en los días 2 a 7 de cada período de mediciones en los dos ordeños con lactómetros manuales (Tru-test by Tru-test Limited, New Zeland). Se colectaron muestras individuales de leche en los 4 ordeños consecutivos en los días 4 y 5 de cada período de mediciones, utilizándose bronopol como conservante, para posteriormente determinar el contenido de grasa, proteína, caseína total, lactosa y nitrógeno ureico en leche por análisis de infra-rojo (model 2000, Bentley Instruments Inc., Chaska, MN IDF, 2000). La producción de leche corregida por grasa (LCG 3,5%) se calculó de la forma descrita por Tyrrell and Reid (1965).

Adicionalmente se tomaron muestras de leche sin conservante las cuales fueron conservadas a -20° C para la determinación del perfil de ácidos grasos en la leche. Para el análisis del perfil, las muestras congeladas se descongelaron a temperatura ambiente y la extracción de la materia grasa se realizó de acuerdo a lo descrito por Feng *et al.* (2004). Una alícuota de 50 mg de la grasa extraída fue disuelta en 100 µL de hexano, seguido de una esterificación con 100 µL de 2 N hidróxido de potasio en metanol para la obtención de FAME, luego fueron separados y cuantificados usando GC-MS (Agilent 7890A GC System, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA) equipado con una columna 60-m (250-µm i.d., 0,25-µm film thickness; Thermo Scientific Inc., Marietta, OH). Se utilizó Helio como gas portador a una velocidad de flujo de 1,0 mL/min. El inyector de temperatura se fijó a 250°C. La temperatura al inicio de la columna se mantuvo por 0,5 min (40°C), luego se incrementó a 25°C/min hasta 175°C y se mantuvo por 10 min, para luego incrementarse a una tasa de 5°C/min hasta 210°C, permaneciendo a esa temperatura por 5 min. Finalmente se incrementó 5°C/min hasta 230°C y se mantuvo a esa temperatura por 5 min.

Los ácidos grasos fueron identificados comparando los tiempos de retención con FAME standards: 37 componentes FAME Mix (47885, Supelco, Bellefonte, PA), trans-11 octadienoico metil ester (46905-U, Supelco), y ácido octadecadienoico metil ester conjugado (O5632, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y con la base del National Institute of Standards and Technology (US Government library).

El índice de $\Delta 9$ -desaturasa y el índice de aterogenicidad fue calculado de la forma descrita por Kelsey *et al.* (2003) y Ulbricht & Southgate (1991), respectivamente.

8.3.6 Determinación de metabolitos y hormonas en sangre

Durante el día 11 de cada período de mediciones se obtuvieron las muestras de sangre de cada vaca por veno-punción de la vena coccígea a las 0, 3, 6, 9, 12 y 15 horas (hora 0 = 0800 h). Se utilizaron tubos con fluoruro de potasio y EDTA (anticoagulante G®; Wiener Laboratorios S.A.I.C., Rosario, Argentina) para la obtención de plasma. Las muestras para obtención de plasma se centrifugaron (3000 rpm) inmediatamente de extraídas durante 15 minutos y el plasma una vez separado se congeló a -18 °C para la posterior determinación de glucosa. También se utilizaron tubos sin anticoagulante para la obtención de suero. Dichas muestras se procesaron a las 6 horas de extraída la sangre y el suero se congeló a -18 °C para la posterior determinación de insulina y urea.

Glucosa y urea se determinaron por métodos colorimétricos usando kits comerciales (BioSystems S.A., Costa Brava 30, Barcelona, España). Para la glucosa, la concentración mínima detectable del ensayo fue de 0,23 mg/dL y los coeficientes de variación intraensayo para los controles bajos (84,6 mg/dL) y altos (266,8 mg/dL) fueron 1,6 y 3,2 %, respectivamente. Para la urea, la concentración mínima detectable del ensayo fue de 1,3 mg/dL y los coeficientes de variación intraensayo para los controles bajos (31,6 mg/dL) y altos (141,9 mg/dL) fueron 6,5 y 7,0 % respectivamente. Las muestras de glucosa y urea se analizaron por duplicado usando un espectrofotómetro Unico 1200 series (United Products & Instruments, Inc, NJ, EE.UU.).

Las concentraciones de insulina se determinaron utilizando el método de análisis inmunorradiométrico (IRMA), con un kit comercial (DIAsource Immuno Assays S.A, Louvain-la-Neuve, Bélgica). La sensibilidad del ensayo fue de 1,7 μ UI/mL, y los coeficientes de variación intraensayo para el control 1 (26,5 μ UI/mL) y el control 2 (94,3 μ UI/mL) fueron 8,5 y 6,4 % respectivamente.

8.3.7 Eficiencia de utilización de materia seca, nitrógeno digestible y energía digestible para producción de leche.

La eficiencia bruta de utilización de la MS para producción de leche fue calculada como el cociente entre producción total de leche (kg/día) y el total de MS consumida (kg/día). La eficiencia de utilización del N digestible consumido se calculó de la manera sugerida por Phoung *et al.* (2013) como el cociente entre N secretado en leche (gr/día) y el total de N digestible consumido (g/día) x 100, mientras que la eficiencia de utilización de la ED se calculó como el cociente entre el total de energía secretada en leche (Mcal/día) y la cantidad de ED total consumida (Mcal/día) x 100 (Phoung *et al.*, 2013). La ED fue calculada con la fórmula sugerida por el NRC (2001):

$$ED \text{ (Mcal/kg)} = 0,04409 \times NTD \text{ (\%)};$$

donde **NTD** son los nutrientes totales digestibles, calculados según lo reportado por el NRC (2001) para cada alimento utilizado en las dietas consumidas por cada vaca en cada período.

8.4 Composición química de los alimentos.

Durante el período de medición de consumo y digestibilidad (días 2 a 9) de cada período se colectaron muestras diarias de la RTM y el FF ofrecido y rechazado por los animales, que se utilizaron para confeccionar una muestra compuesta para cada período. Las muestras compuestas fueron congeladas, luego secadas a estufa a 55°C y se molieron en un molino con tamaño de malla de 1 mm. Previo a su análisis se determinó el contenido de MS, cenizas, MO (100-% cenizas), PB (N x 6,25) según (AOAC, 1990), nitrógeno insoluble en detergente neutro (Licitra *et al.*, 1996), FND, FAD y lignina ácido detergente de acuerdo con la técnica descrita por Robertson y Van Soest (1981), usando un analizador de fibra Ankom220 (Ankom Technology Corp. Fairport, NY, USA). Las concentraciones de EE fueron determinadas utilizando un equipo para la extracción de grasas (Goldfisch, Labconco 35001, Texas, USA) mediante un reflujo de éter de petróleo a 180°C durante 3 h, de acuerdo con la técnica descrita por Nielsen (2003). El contenido de AS siguiendo la técnica descrita por Yemm y Willis (1954). El contenido de carbohidratos no fibrosos y de ENL de los alimentos se calculó de la forma sugerida por el NRC (2001). Los análisis realizados en heces (MS, cenizas, FND, FAD) son los mismos que para los alimentos. Todas las muestras se analizaron por triplicado, aceptando coeficientes de variación entre análisis del 3 al 5 % según el parámetro.

8.5 Análisis estadístico.

Los datos fueron analizados con la versión 9.0 del software de SAS (SAS Institute Inc, Cary, NC, EE.UU.). Los datos fueron sometidos inicialmente a un análisis para detectar valores atípicos y para comprobar la normalidad de los residuales mediante procedimientos univariantes (PROC UNIVARIATE).

Los datos de las variables con una medición en cada período como consumo, producción y composición de la leche, perfil de ácidos grasos (AG), balance de nitrógeno, flujo de proteína microbiana, así como las eficiencias de producción de leche se analizaron utilizando el procedimiento PROC MIXED de SAS (2002) de acuerdo al modelo lineal mixto:

$$Y_{ijkl} = \mu + C_i + V_j(C_i) + P_k + T_l + e_{ijkl},$$

donde Y_{ijkl} es la variable dependiente, C_i es el efecto aleatorio del cuadrado, $V_j(C_i)$ efecto variable de vaca dentro del cuadrado, P_k efecto aleatorio del período, T_l el efecto fijo del tratamiento y e_{ijkl} es el error residual.

Los datos de las variables con mediciones repetidas en el tiempo en cada período como concentración sanguínea de urea, glucosa e insulina se analizaron utilizando el procedimiento PROC MIXED de SAS (2002) de acuerdo al modelo lineal mixto:

$$Y_{ijklm} = \mu + C_i + V_j(C_i) + P_k + T_l + H_m + T_l \times H_m + e_{ijklm},$$

donde Y_{ijklm} es la variable dependiente, C_i es el efecto aleatorio del cuadrado, $V_j(C_i)$ efecto variable de vaca dentro del cuadrado, P_k efecto aleatorio del período, T_l el efecto fijo del tratamiento, H_m efecto fijo de la hora, $T_l \times H_m$ efecto fijo de la interacción del tratamiento x la hora y e_{ijklm} es el error residual.

Las medias de todos los parámetros evaluados fueron comparadas mediante el test de Tukey. Se aceptaron como diferencias significativas valores de P inferiores o iguales a 0,05 y como tendencia valores de P mayores a 0,05 y menores a 0,1.

9. RESULTADOS

9.1 Consumo y digestibilidad.

En el cuadro III se presenta el consumo y la digestibilidad de la MS y MO. El consumo diario de MS y MO fue menor en el tratamiento RTM50 con respecto a RTM100 y RTM75, no existiendo diferencias entre estos últimos. Similar comportamiento se observa cuando el CMS es expresado como porcentaje de PV, donde no hubo diferencias entre RTM100 y RTM75, pero sí entre RTM100 y RTM50. Se detectó una tendencia de que el CMS como % PV fuera mayor en RTM75 cuando se lo compara con RTM50 ($P < 0,08$).

Cuadro III. Consumo y digestibilidad de la materia seca y materia orgánica en vacas lecheras de alta producción alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF (RTM100, RTM75, RTM50).

	Tratamientos ¹			EEM	P ²
	RTM100	RTM75	RTM50		T
Consumo MS					
RTM (kg/día)	24,8 ^a	17,6 ^b	12,1 ^c	0,84	<0,001
Forraje fresco (kg/día)	0,0	7,0 ^a	10,7 ^b	0,29	<0,001
Total (kg/día)	24,8 ^a	24,6 ^a	22,8 ^b	0,94	0,018
Total (% del peso vivo)	4,3 ^a	4,3 ^{abx}	4,0 ^{by}	0,17	0,029
RTM (% en la dieta total)	100,0 ^a	71,3 ^b	52,9 ^c	1,11	<0,001
FF (% en la dieta total)	0,0 ^a	28,7 ^b	47,1 ^c	1,11	<0,001
Consumo de MO (kg/día)	23,0 ^a	22,4 ^a	20,4 ^b	0,78	0,001
Consumo de MOD³ (kg/día)	17,8 ^a	17,4 ^{abx}	16,0 ^{by}	0,64	0,023
Digestibilidad aparente					
MS (%)	77,7	78,0	78,2	0,49	0,778
MO (%)	77,2	77,9	78,5	0,62	0,366

^{a,b} Letras diferentes en un mismo renglón indican diferencias significativas, $P < 0,05$. ^{xy} Letras diferentes en un mismo renglón indican tendencias, $0,05 < P > 0,1$. ¹ Tratamientos: RTM100= 100% RTM; RTM75= 75%RTM + 25% FF; RTM50= 50% RTM + 50% FF. ² P = Efecto de tratamiento. ³ MOD= Materia orgánica digestible. EEM: error estándar de las medias.

La proporción de alimentos asignados en las dietas de las vacas se realizó en función de los porcentajes correspondientes a cada tratamiento. Sin embargo la relación RTM:FF final incluido en ambos tratamientos que incluyen FF fue 71:29 para RTM75 y 53:47 para RTM50.

En relación a la digestibilidad de la MS y MO ingerida, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos.

9.2 Balance de nitrógeno.

En el cuadro IV se muestra el consumo y la excreción de N en orina, heces y leche. El consumo total de N fue mayor en ambos tratamientos con mayor porcentaje de RTM en la dieta cuando se compara con RTM50. Además, se observó una tendencia a que RTM100 tuviera mayor consumo total de N que RTM75 ($P = 0,087$).

Cuanto mayor es la proporción de RTM en la dieta mayor es la cantidad de N en excretas. El mismo comportamiento se observó en la cantidad de N en orina, siendo mayor el nivel de excreción en RTM100, seguido por RTM75 y RTM50. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la cantidad de N en heces entre tratamientos. La cantidad de N excretado por leche fue mayor en los tratamientos con mayor porcentaje de RTM en la dieta con respecto a RTM50, quien presentó el menor valor, mientras que RTM100 y RTM75 no difirieron entre sí. El valor biológico del N consumido no presentó diferencias entre tratamiento.

Cuadro IV. Consumo, partición y balance de N en vacas lecheras de alta producción alimentadas con diferentes combinaciones de RTM y FF (RTM100, RTM75, RTM50).

	Tratamientos ¹			EEM	P ²
	RTM100	RTM75	RTM50		T
Consumo de N, g/d	715,4 ^{ax}	673,2 ^{ay}	606,6 ^b	26,18	<0,001
Excreción de N, g/d					
N en Leche	161,7 ^a	159,6 ^a	148,2 ^b	6,10	0,004
N en Orina	335,7 ^a	309,3 ^b	279,8 ^c	13,71	<0,001
N en Heces	144,5	137,5	134,5	7,16	0,276
N en Excretas	480,1 ^a	446,7 ^b	414,2 ^c	13,23	<0,001
Balance N	73,6 ^a	66,9 ^a	44,2 ^b	8,26	0,009
valor biológico ³ %	40,8	41,6	40,8	5,03	0,971
N, % del CN					
N en Leche	22,7 ^x	23,9 ^{xy}	24,5 ^y	0,72	0,069
N en Orina	47,2	46,5	46,0	1,51	0,771
N en Heces	20,2	20,4	22,3	1,58	0,174
N en Excretas	67,4	66,8	68,3	2,43	0,819
N Retenido	9,9	9,3	7,2	1,91	0,428

^{a,b}Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas, $P < 0,05$. ^{xy}Letras diferentes en una misma fila indican tendencias, $0,05 < P > 0,1$. ¹Tratamientos: RTM100= 100% RTM; RTM75= 75%RTM + 25% FF; RTM50= 50% RTM + 50% FF. ²P = Efecto de tratamiento. ³Valor biológico= $[(N \text{ consumido} - (N \text{ heces} + N \text{ orina})) / (N \text{ consumido} - N \text{ heces})] \times 100$. CN= Consumo de N. EEM: error estándar de las medias.

El balance de N fue positivo para los tres tratamientos, siendo mayor para los tratamientos RTM100 y RTM75 comparados con RTM50, y no se encontraron diferencias estadísticas entre RTM100 y RTM75.

Con respecto a la excreción de N en leche, orina y heces como porcentaje del N consumido (Cuadro IV), se observa que no hubo diferencias entre tratamientos tanto para N en orina, N en heces, ni para N en excretas, sin embargo para N en leche se observa una tendencia a que en RTM100 es menor que en RTM50 ($P=0,069$), mientras que el tratamiento RTM75 no tuvo diferencias ni con RTM100 ni con RTM50. Finalmente, el N retenido como porcentaje del N consumido no presentó diferencias estadísticas entre tratamientos.

9.3 Derivados púricos y flujo de N microbiano a duodeno.

Como se muestra en el cuadro V, la concentración total de DP en orina no presentó diferencias entre tratamientos, sin embargo sí se observan diferencias en la producción diaria total de DP (mmol/d), siendo para RTM100 y RTM75 mayor que para RTM50,

no observándose diferencias entre estos. Tanto la concentración de alanina y ácido úrico como la de creatinina no presentaron diferencias entre tratamientos. La relación DP:creatinina fue menor en RTM50 con respecto a RTM100 y RTM75, pero no se observaron diferencias entre RTM100 y RTM75.

El flujo de N microbiano fue menor en el tratamiento RTM50, pero no difirió entre los tratamientos RTM100 y RTM75. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos para la eficiencia de utilización del N para síntesis de N microbiano (EUN-NM).

Cuadro V. Producción de derivados púricos en orina y flujo de proteína microbiana a duodeno en vacas lecheras de alta producción alimentadas con diferentes combinaciones de RTM y FF (RTM100, RTM75, RTM50).

Item	Tratamientos ¹				P ²
	RTM100	RTM75	RTM50	EEM	T
Creatinina, mM	8,4	8,8	9,0	0,46	0,503
Alantoina, mM	22,1	21,1	19,4	1,11	0,134
Acido úrico, mM	2,1	2,3	2,2	0,18	0,383
DP, mM	24,2	23,4	21,6	1,13	0,166
DP:Creatinina	2,9 ^a	2,7 ^a	2,4 ^b	0,09	0,009
DP, mmol/d	424,4 ^a	392,7 ^a	359,2 ^b	14,63	0,026
N Microbiano, g/d	286,1 ^a	261,5 ^a	233,6 ^b	11,42	0,028
EUN-NM	0,40	0,39	0,39	0,02	0,872
EUMOD	16,0	15,3	14,8	0,73	0,440

^{a,b}Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas, $P < 0,05$. ¹Tratamientos: RTM100= 100% RTM; RTM75= 75%RTM + 25% FF; RTM50= 50% RTM + 50% FF. ²P = Efecto de tratamiento. EUN-NM: Eficiencia de utilización del N ingerido para N microbiano ($EUN = g \text{ de N microbiano/d} / g \text{ Consumo de N/d}$). EUMOD: eficiencia de utilización de la MO digestible para síntesis de N microbiano ($EUMOD = g \text{ de N microbiano/d} / g \text{ Consumo de MO Digestible/d}$). EEM: error estándar de las medias.

9.4 Producción y composición de la leche.

La producción y composición de la leche se describe en el cuadro VI. Se observa que la producción de leche fue mayor en los tratamientos RTM100 y RTM75 respecto a RTM50, mientras que no se detectó diferencias entre RTM100 y RTM75. Tanto la producción de leche corregida por grasa fue menor en el tratamiento RTM50 comparado con RTM100 y RTM75, y no se observaron diferencias entre RTM100 y RTM75.

Con respecto a la composición de la leche, cuando esta fue medida como porcentaje, tanto para la grasa como para proteína no se observaron diferencias significativas entre los tres tratamientos. Sin embargo para la lactosa ($P=0,070$), se observa que existe tendencia de que RTM75 sea mayor que RTM50, no observándose diferencias entre RTM100 y RTM75 ni entre RTM100 y RTM50.

Cuando los sólidos son expresados en kg/d, tanto para la grasa como para proteína y lactosa, se observa que la producción fue mayor en los tratamientos RTM100 y RTM75 con respecto a RTM50, mientras que entre RTM100 y RTM75 no se observaron diferencias. En el caso del MUN, el tratamiento RTM50 fue el que presentó menor nivel que RTM100 y RTM75, observándose una diferencia de 4,2 y 2,3 mg/dl respectivamente.

Cuadro VI. Producción y composición de leche de vacas lecheras de alta producción alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF (RTM100, RTM75, RTM50).

	Tratamientos ¹			P ²	
	TMR100	TMR75	TMR50	EEM	T
Leche , kg/d	31,0 ^a	30,0 ^a	27,9 ^b	1,02	<0,001
LCG 3,5% ² , kg/d	33,9 ^a	33,0 ^a	30,3 ^b	1,43	<0,001
Grasa					
%	4,11	4,14	4,06	0,14	0,746
kg/d	1,26 ^a	1,24 ^a	1,13 ^b	0,06	<0,001
Proteína					
%	3,37	3,40	3,39	0,08	0,620
kg/d	1,04 ^a	1,02 ^a	0,94 ^b	0,04	<0,001
Lactosa					
%	4,75 ^{xy}	4,78 ^y	4,74 ^x	0,02	0,070
kg/d	1,46 ^a	1,43 ^a	1,32 ^b	0,05	<0,001
MUN , mg/dl	24,7 ^a	22,8 ^a	20,5 ^b	1,83	<0,001
Caseína Total					
%	2,44	2,49	2,47	0,08	0,394
kg/d	0,76 ^a	0,73 ^a	0,68 ^b	0,04	<0,001
Caseína/Proteína	0,73	0,72	0,72	0,01	0,684

^{a,b}Letras diferentes en un mismo renglón indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$). ^{xy}Letras diferentes en un mismo renglón indican tendencias, $0,05 < P > 0,1$. ¹Tratamientos: RTM100= 100% RTM; RTM75= 75%RTM + 25% FF; RTM50= 50% RTM + 50% FF. ²P= Efecto de tratamiento. ²LCG 3,5%= $0,4324 \times \text{leche (kg)} + 16,218 \times \text{Grasa (kg)}$, de acuerdo con Tyrrell and Reid (1965). ³ MUN = Nitrógeno ureico en leche. EEM: Error estándar de las medias.

El nivel de caseína total no difirió entre tratamientos cuando es expresado como porcentaje, mientras que cuando se expresa en kg/d la mayor producción se observa en los tratamientos RTM100 y RTM75 respecto de RTM50, no habiéndose detectado diferencias entre RTM100 y RTM75. La relación caseína:proteína no presentó diferencias entre tratamientos, representando la caseína en promedio el 72% de las proteínas de la leche.

9.5 Perfil de ácidos grasos e índice de aterogenicidad.

El perfil de AG de la leche se muestra en el cuadro VII. Se observa que no hubo diferencias entre tratamientos para la mayoría de los AG analizados a excepción del Palmítico, Vaccénico, Ruménico, Linoleico y Linolénico.

El tratamiento con mayor contenido de FF (RTM50) tuvo mayor contenido de AG Linolénico (18:3 *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15, **LI**), Vaccénico (18:1 *trans*-11, **VA**) y Ruménico (18:2 *cis*-9, *trans*-11, **RU**) que RTM100 ($P < 0,001$). A su vez, el contenido de LI y VA fue mayor en RTM75 que en RTM100 ($P < 0,001$). En el caso del RU se observa una tendencia a que RTM75 presente mayor contenido que RTM100 ($P = 0,09$). Con respecto al Linoleico (18:2 *cis*-9, *cis*-12, **LN**) el mayor contenido se observó en el tratamiento RTM100, seguido por RTM75 mientras que en RTM50 fue donde hubo menor contenido.

Cuadro VII. Perfil de ácidos grasos de la leche de vacas lecheras de alta producción alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF (RTM100, RTM75, RTM50).

Ítem	Tratamientos ¹			EEM	P ²
	RTM100	RTM75	RTM50		T
Contenido de ácidos grasos (g / 100 g del total de ácidos grasos)					
4:0 (Butírico)	2,16	2,15	1,98	0,14	0,577
6:0 (Caprónico)	2,17	2,16	1,98	0,12	0,368
8:0 (Caprílico)	1,71	1,71	1,55	0,10	0,131
10:0 (Cáprico)	4,11	4,10	3,82	0,31	0,249
10:1 trans-4 (Trans Decanoico)	0,45	0,44	0,43	0,02	0,821
11:0 (Undecanoico)	0,08	0,08	0,08	0,01	0,888
12:0 (Laurico)	4,98 ^x	4,87 ^{xy}	4,50 ^y	0,33	0,052
13:0 (Tridecanoico)	0,13	0,12	0,11	0,01	0,338
14:0 (Mirístico)	13,21	13,28	13	0,49	0,472
14:1 Cis-9 (Miristoleico)	1,51	1,46	1,54	0,11	0,666
15:0 (Pentadecanoico)	1,38	1,35	1,40	0,10	0,741
16:0 (Palmítico)	36,10 ^a	34,27 ^b	34,43 ^b	0,73	<0,001
16:1 Cis-9 (Palmitoleico)	2,39	2,33	2,44	0,22	0,572
17:0 (Margarico)	0,54	0,54	0,53	0,03	0,939
17:1 Cis-10 (Cis Heptadecanoico)	0,18	0,19	0,19	0,02	0,761
18:0 (Esteárico)	7,98 ^x	8,73 ^{xy}	8,77 ^y	0,54	0,072
18:1 trans-9 (Elaídico)	0,26	0,28	0,30	0,02	0,282
18:1 trans-11 (Vaccénico)	0,97 ^a	1,44 ^b	1,88 ^c	0,16	<0,001
18:1 cis-9 (Oleico)	16,88	17,64	18,03	1,00	0,199
18:2 cis-9, cis-12 (Linoleico)	2,11 ^a	1,76 ^b	1,52 ^c	0,11	<0,001
18:2 cis-9, trans-11 (Ruménico)	0,40 ^{ax}	0,60 ^{ay}	0,88 ^b	0,10	<0,001
18:3 cis-9, cis-12, cis-15 (Linolénico)	0,25 ^a	0,38 ^b	0,48 ^c	0,04	<0,001
20:0 (Araquídico)	0,08	0,07	0,07	0,01	0,541
20:1 Cis-11 (Cis Eicosanoico)	0,07	0,06	0,06	0,01	0,722

^{a,b}Letras diferentes en un mismo renglón indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$). ^{xy}Letras diferentes en un mismo renglón indican tendencias, $0,05 < P > 0,1$. ¹Tratamientos: RTM100= 100% RTM; RTM75= 75%RTM + 25% FF; RTM50= 50% RTM + 50% FF. ²P= Efecto de tratamiento. EEM: Error estándar de las medias.

En el cuadro VIII se muestra el grado de saturación de la grasa láctea, el origen de los AG y los principales índices relacionados. El total de AG saturados (g/100g de AG) fue mayor en RTM100 respecto de RTM50, mientras que no se observaron diferencias entre RTM100 y RTM75, ni entre RTM75 y RTM50. Coincidentemente, se observó que el contenido de AG insaturados fue mayor en RTM50 respecto a RTM100, no detectándose diferencias entre RTM100 y RTM75 ni entre RTM75 y RTM50.

En contenido de AG mono-insaturados (AGMI) fue mayor en RTM50 respecto a RTM100, mientras que RTM75 no difirió de RTM100 ni de RTM50. Con respecto a los AG poli-insaturados (AGPI) no se observaron diferencias entre tratamientos. Se observó una tendencia a que la relación entre AG Saturados:Insaturados fuera menor en RTM50 que en RTM100, sin embargo no hubo diferencias tanto entre RTM100 y RTM75, ni entre RTM75 y RTM50.

Cuadro VIII. Saturación, origen e índice de aterogenicidad de la grasa de la leche de vacas lecheras de alta producción alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF (RTM100, RTM75, RTM50).

Ítem	Tratamientos ¹			EEM	P ²
	RTM100	RTM75	RTM50		T
g/100 g del total de ácidos grasos					
Saturados	74,42 ^a	73,42 ^{ab}	72,21 ^b	1,23	0,049
AGMI	22,82 ^a	23,84 ^{ab}	24,91 ^b	1,14	0,031
AGPI	2,75	2,74	2,88	1,17	0,617
Insaturados	25,58 ^a	26,58 ^{ab}	27,79 ^b	1,23	0,049
Saturados / insaturados	2,93 ^x	2,80 ^{xy}	2,63 ^y	0,17	0,052
Sumatoria según origen					
De novo (4:0-15:0)	31,96	31,72	30,39	1,38	0,195
Origen Mixto (16:0+16:1)	38,48 ^a	36,60 ^b	36,87 ^b	0,84	0,002
Preformados (>17:0)	29,55 ^a	31,68 ^{ab}	32,74 ^b	1,36	0,031
Índices y relaciones					
Relación n-6:n-3	9,15 ^a	4,80 ^b	3,31 ^c	0,45	<0,001
Índice de aterogenicidad ²	3,73 ^a	3,52 ^{ab}	3,31 ^b	0,24	0,038
Δ^9 – Índice de Desaturasa	0,27	0,28	0,28	0,11	0,132

^{a,b}Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$). ^{xy}Letras diferentes en una misma fila indican tendencias, $0,05 < P > 0,1$. ¹Tratamientos: RTM100= 100% RTM; RTM75= 75%RTM + 25% FF; RTM50= 50% RTM + 50% FF. ²P= Efecto de tratamiento. ²Calculado según Ulbricht y Southgate (1991). EEM: Error estándar de las medias. AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados. AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados.

Con respecto al origen los AG presentes en la leche, se observó que no hubo diferencias entre tratamientos de los AG sintetizados *de novo* en la glándula mamaria. RTM50 presentó mayor contenido de AG preformados respecto a RTM100, mientras que no se detectaron diferencias entre RTM100 y RTM75, ni entre RTM75 y RTM50. Con respecto al contenido de AG que presentan un origen mixto, el tratamiento RTM100 fue quien presentó mayor contenido, mientras que no se observaron diferencias entre RTM75 y RTM50.

La relación n-6:n-3 fue diferente para los tres tratamientos siendo mayor en RTM100 y menor en RTM50, presentando RTM75 un valor intermedio entre estos. El índice Δ^9 – desaturasa no presentó diferencias entre tratamientos. El índice de aterogenicidad fue mayor en RTM100 respecto a RTM50, mientras que no se detectaron diferencias tanto entre RTM100 y RTM75, como entre RTM75 y RTM50.

9.6 Metabolitos y hormonas sanguíneas.

Para la urea en sangre (figura 2) se observaron diferencias entre tratamientos siendo RTM100 mayor que RTM75, y en RTM75 mayor que RTM50 ($P < 0,001$), siendo los valores promedios (mg/dL) 15,68; 10,87 y 8,96, respectivamente (EEM=1,32). No se detectó interacción significativa tratamiento-hora, pero sí se observó un efecto hora ($P < 0,001$), siendo los valores sanguíneos de urea promedio (mg/dL) 12,5; 14,1; 12,5; 10,9; 10,9 y 10,1 a la hora 0; 3; 6; 9; 12 y 15 respectivamente (EEM= 1,33). Las vacas de todos los tratamientos aumentaron la uremia hacia la hora 3 post inicio de la ingesta, luego se produce un descenso hasta la hora 9, realizando un segundo ascenso de la uremia hacia la hora 12 post inicio de la ingesta.

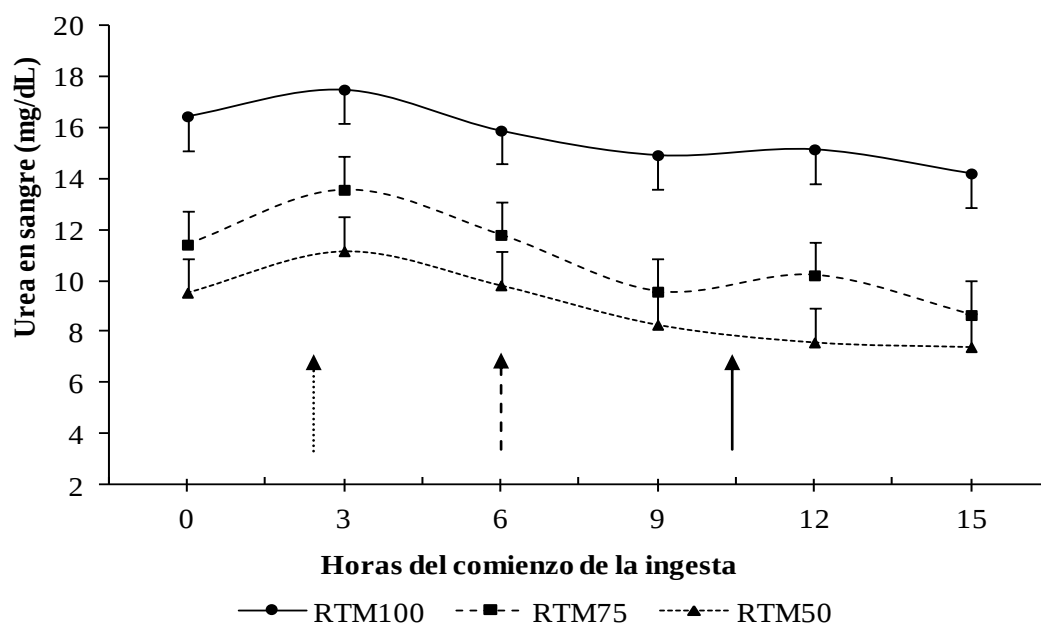


Figura 2. Nivel de urea en sangre de vacas Holando alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF (RTM100, RTM75, RTM50) (media $\pm$ error estándar de la media). RTM100 = 100% RTM, RTM75 = 75% RTM + 25% forraje fresco, RTM 50 = 50% RTM + 50% forraje fresco. $\blacktriangleright$ = RTM75 y RTM50 comienzan con ingesta de forraje fresco. - - - $\blacktriangleright$ = RTM75 retoman la ingesta de RTM. $\longrightarrow$ = RTM50 retoman la ingesta de RTM.

En la figura 3 se muestra la dinámica de la glucosa en sangre de vacas en función del tratamiento asignado. Para la misma se detectó efecto del tratamiento ($P=0,012$), donde la media fue superior para el tratamiento RTM100 respecto de RTM50 (66,32 y 62,27 mg/dL respectivamente EEM=1,96), mientras que no hubo diferencias entre RTM100 y RTM75 (64,41 mg/dL) y RTM75 y RTM50. No se detectó efecto para la hora, ni interacción del tratamiento por hora.

Con respecto a la insulinemia (figura 4), no se detectó efecto del tratamiento, siendo los valores promedio para RTM100, RTM75 y RTM50 de 26,71; 25,85 y 24,42 μ UI/ml respectivamente (EEM=3,06). Tampoco se detectó interacción del tratamiento por la hora, pero hubo efecto de la hora ($P<0,001$), siendo los valores promedios para cada hora de 21,6; 24,1; 24,6; 27,0; 31,3 y 25,4 μ UI/ml para la hora 0, 3, 6, 9, 12 y 15 respectivamente (EEM=3,15). El nivel de insulinemia comienza en el valor más bajo del día a la hora 0 en los tres tratamientos para ir aumentando a medida que avanzan las horas, alcanzando el valor más alto cercano a la hora 12 post inicio de la ingesta.

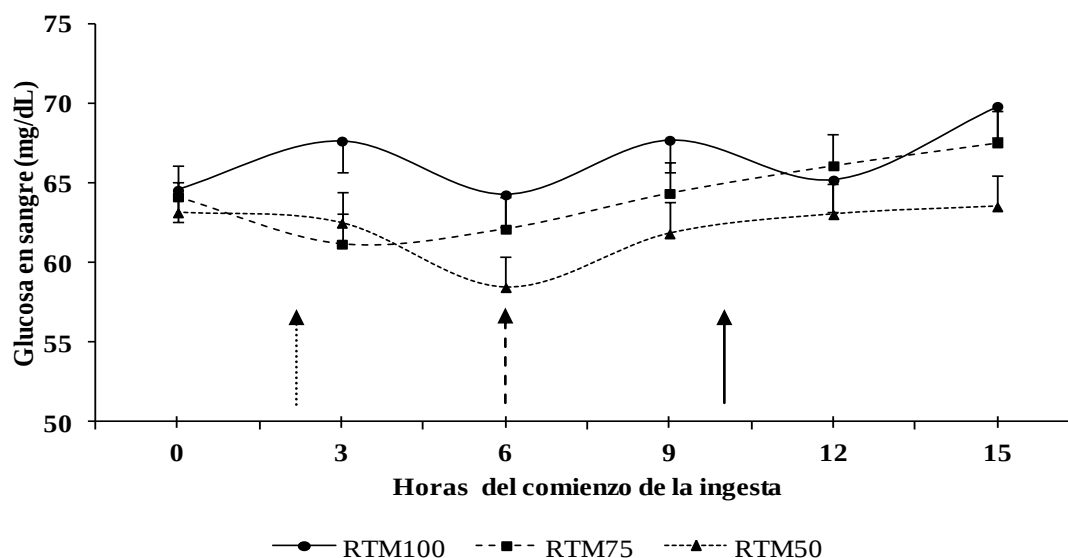


Figura 3. Nivel de glucosa en sangre de vacas alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF (RTM100, RTM75, RTM50). (Media $\pm$ error estándar de la media). RTM100 = 100% RTM, RTM75 = 75% RTM + 25% forraje fresco, RTM 50 = 50% RTM + 50% forraje fresco. $\blacktriangleright$ = RTM75 y RTM50 comienzan con ingesta de forraje fresco. ---- $\blacktriangleright$ = RTM75 retoman la ingesta de RTM. $\longrightarrow$ = RTM50 retoman la ingesta de RTM.

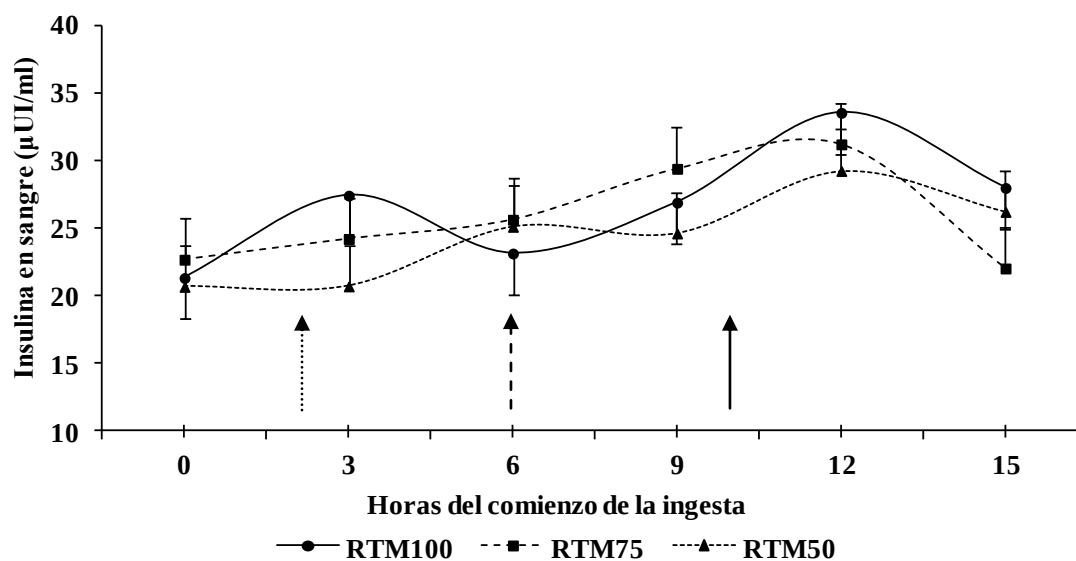


Figura 4. Nivel de insulina en sangre de vacas alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF (RTM100, RTM75, RTM50). (Media $\pm$ error estándar de la media). RTM100 = 100% RTM, RTM75 = 75% RTM + 25% forraje fresco, RTM 50 = 50% RTM + 50% forraje fresco. $\blacktriangleright$ = RTM75 y RTM50 comienzan con ingesta de forraje fresco. ---- $\blacktriangleright$ = RTM75 retoman la ingesta de RTM. $\longrightarrow$ = RTM50 retoman la ingesta de RTM.

9.7 Eficiencia de utilización de MS, de utilización del N y de utilización de la energía.

En relación a la eficiencia de utilización de la MS (EUMS), tal como se muestra en el cuadro IX, no se detectó efecto del tratamiento, siendo necesario el consumo promedio de 0,81 kg de MS para producir un kg de leche.

Cuadro IX. Eficiencias de utilización de la MS, N digestible y E digestible en vacas lecheras de alta producción alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF (RTM100, RTM75, RTM50).

	Tratamientos ¹			EEM	P ²
	RTM100	RTM75	RTM50		T
EUMS, kgMS/kg leche	0,80	0,81	0,82	0,03	0,694
EUND ³ , %	28,6 ^a	30,0 ^{ab}	31,6 ^b	1,53	0,009
EUED ³ , %	29,8 ^a	31,5 ^{ab}	32,2 ^b	1,15	0,040

^{a,b}Letras diferentes en un mismo renglón indican diferencias significativas, $P < 0,05$. ¹Tratamientos: RTM100= 100% RTM; RTM75= 75%RTM + 25% FF; RTM50= 50% RTM + 50% FF. ²P= Efecto de tratamiento. ³Se calculó según la fórmula $EUND = (g \text{ de N secretados en leche}) / (g \text{ de N digestible ingeridos}) \times 100$ y $EUED = (Mcal \text{ secretadas en leche}) / (Mcal \text{ de E digestible ingeridas}) \times 100$ (Phuong y col., 2013). EUMS: Eficiencia de utilización de MS. EUND: Eficiencia de utilización del N digestible. EUED: Eficiencia de utilización de la Energía digestible. EEM: Error estándar de las medias.

La EUND presentó efecto del tratamiento, donde la mayor eficiencia la presentó el tratamiento RTM50, siendo un 3 % superior que RTM100, mientras que no hubo diferencias entre RTM100 y RTM75, ni entre RTM75 y RTM50. Similar resultado se observó con la EUED, para la cual también se detectó efecto para el tratamiento y la mayor eficiencia la presentó el tratamiento RTM50, superando en un 2,4% a RTM100. No se observaron diferencias entre RTM100 y RTM75, ni entre RTM75 y RTM50 (cuadro IX).

10. DISCUSIÓN

Los valores de composición química de las dietas utilizadas son coherentes con los porcentajes de inclusión de FF y RTM en cada tratamiento. Antes de comenzar con el análisis de los resultados es importante destacar que la pastura utilizada durante el experimento presentó valores de MS y PB promedio que no alcanzaron a los valores promedios definidos por Bargo *et al.* (2003) para pasturas de buena calidad (18 a 24% de MS, 18 a 25% de PB, 40 a 45% de FND y de 1,53 a 1,67 Mcal/kgMS de ENL). Esto podría haber estado determinado por la baja fertilización nitrogenada de la pastura al momento de la siembra e implantación. Por otra parte, el porcentaje de MS de la RTM utilizada ($38\% \pm 1,8$) fue inferior al % alcanzado por las RTM utilizadas en los trabajos revisados en el marco teórico, los cuales alcanzan valores que rondan el 50% de MS. Esto está explicado en parte, por el bajo porcentaje de MS que presentó el silo de maíz utilizado ($23,1\% \pm 1,5$) y a que no se incluyó en la RTM silo ni heno de pasturas.

El porcentaje de FND y FND efectiva calculados para las diferentes dietas completas estuvieron por encima de las recomendaciones mínimas para bovinos de estas características según NRC, (2001). Asimismo, los contenidos de CNF sugieren una buena disponibilidad de carbohidratos de fácil fermentación en rumen. La concentración de PB de la dieta total de los tres tratamientos estuvo por encima de los requerimientos para vacas lecheras de las características anteriormente mencionadas. Son varios los autores que mencionan que en vacas de alta producción aumentar el tenor de PB en ración de 16 a 17% e incluso hasta 20% no genera aumentos significativos en el nivel de producción de leche (Broderick, 2003; Leonardi *et al.*, 2003; Ipharraguerre & Clark, 2005; Reynal & Broderick, 2005; Groff & Wu, 2005; Olmos Colmenero & Broderick, 2006).

La disminución del consumo total de MS y MO a medida que aumenta el porcentaje de FF en la dieta coincide con lo reportado por varios autores (Bargo *et al.*, 2002; Mendoza *et al.*, 2016; Kolver & Muller, 1998; Vibart *et al.*, 2008). Sin embargo esta disminución es menos acusada e incluso inexistente cuando el FF ocupó aproximadamente un 29% de la dieta total, lo que coincide con lo reportado por Vibart *et al.* (2008), Morales-Almaráz *et al.* (2010) y Soriano *et al.* (2001). Esto podría estar explicado por el consumo de FND, el cual solamente presentó diferencias entre tratamientos extremos (10,2 vs 9,4 kg/día para RTM100 y RTM50 respectivamente. EEM= 1,81 según lo reportado por Pomiés (2014) para este mismo experimento), ya que la FND es uno de los principales factores que regulan el consumo de los animales (Van Soest, 1994; Forbes, 1996; Allen, 1999). En el presente trabajo, los animales parecen haber consumido hasta lograr un consumo constante de FND total ya que no se observaron diferencias entre tratamientos, siendo el consumo promedio de FND el 41% del total de la MS ingerida (Pomiés, 2014). Otro de los factores que pueden jugar un papel importante en la regulación del consumo es el nivel y proporción de AGV en rumen. En este trabajo no parecen haber sido determinantes, ya que no se observaron diferencias en el nivel de AGV total en rumen (mmol/L) ni en particular para el acético, propiónico y butírico (Pomiés, 2014).

Tanto el consumo de MO como de MO digestible (MOD) son coherentes con los resultados de consumo de MS y con la ausencia de diferencias en la digestibilidad aparente de la MO, aunque hubiera sido esperable que la dieta RTM100 presentara una mayor digestibilidad de la MO, ya que usualmente los concentrados presentan mayor digestibilidad de la MO que los forrajes (Bargo *et al.* 2003; Dixon & Stockdale, 1999).

El menor consumo de N se observó en el tratamiento RTM50. Si bien hubiera sido lógico que el mayor consumo de N se observará en RTM50, ya que el porcentaje de PB de las pasturas de alta calidad (habitualmente entre 18 y 25% como ya se mencionó) es más elevado que el de una RTM correctamente formulada para cubrir los requerimientos de las vacas lecheras de alta producción, este resultado está en concordancia con el consumo de MS y con el porcentaje de PB de las dietas totales. Este menor porcentaje de PB en las dietas que incluyen FF (17,1 y 16,6% para RTM75 y RTM50 respectivamente) podría explicarse por el bajo porcentaje de PB de la pastura utilizada. Este resultado es coincidente con el obtenido por Vibart *et al.*, 2008, quienes utilizaron también Raigrás, pero en un estado avanzado de madurez, con aproximadamente 14 % de PB, quienes observaron un menor consumo de N en los tratamientos con mayor nivel de inclusión de pastura. También Mendoza *et al.* (2016) observaron un mayor consumo de N en los tratamientos con menor nivel de consumo de FF.

La mayor excreción de N urinario en RTM100 podría estar explicado por el consumo de N alcanzado por los animales en ese tratamiento y probablemente por la cantidad de proteína degradable disponible a nivel ruminal en los diferentes tratamientos, dado que posiblemente la harina de soja constituyente de la RTM tuviera una mayor cantidad de proteína degradable a nivel ruminal que lo esperado. Este hecho es consistente con el porcentaje de NDIN observado en la harina de soja utilizada ($1,4 \pm 0,1\%$), porcentaje bastante inferior a los esperado para dicho alimento (5,0 % según Sniffen *et al.*, 1992). La ausencia de diferencias significativas entre tratamientos en la cantidad de N excretado por heces, a pesar de las diferencias observadas en el consumo de N entre RTM50 y los restantes dos tratamientos (RTM75 y RTM100), podría estar explicada por la alta digestibilidad de la proteína consumida en la dieta en los tres tratamientos, la cual alcanzó el $78,9\% \pm 2,02$ (datos de Pomiés, 2014 sobre este mismo experimento) y a que según Van Soest *et al.* (1994) la excreción de N por las heces representa el 0,6% del total de la MS consumida, que si bien se observaron diferencias entre tratamientos, tal vez esta diferencia no fue suficiente para observar una mayor excreción de N fecal.

El mayor N excretado por leche en RTM100 y RTM75 es consistente con los mayores consumos de MS y ENL (40,2 vs 36,5 Mcal/día. EEM = 1,52 reportado por Pomiés, 2014) observados en cada tratamiento. Este resultado coincide con los resultados obtenidos por Kolver & Muller (1998), Bargo *et al.* (2002), Vibart *et al.* (2008) cuando utilizó una pastura en estado avanzado de madurez, y Mendoza *et al.* (2016), quienes también observaron mayor excreción de N en leche en los tratamientos con mayores niveles de RTM en la dieta.

Con respecto al balance de N, fue positivo en los tres tratamientos, lo cual es consistente con los días en lactancia de las vacas utilizadas, ya que el período de mayor movilización de tejidos y reservas trascurrió en una etapa anterior al desarrollo del experimento. El mayor balance de N en los tratamientos RTM100 y RTM75 respecto a RTM50 es coincidente con la mayor ingesta de RTM en esos tratamientos, ya que probablemente se ingirieran mayor cantidad de sustratos glucogénicos, permitiendo que una mayor proporción de aminoácidos no tomen la ruta neoglucogénica y queden disponibles para la síntesis proteica (Kozloski, 2011).

El flujo de N de origen microbiano al duodeno, como reflejo de la síntesis de proteína microbiana a nivel ruminal, fue mayor en RTM100 y RTM75 lo cual es coincidente con

los mayores consumos de MS, MO, MOD y N, así como también de ENL reportados por Pomiés (2014) para estos tratamientos. En este sentido, Clark *et al.* (1992) afirman que cuando el N en rumen no es limitante, la síntesis de proteína microbiana está fuertemente relacionada al consumo de MO y a la proporción de ésta que es fermentada en rumen. Otra explicación de estos resultados podría ser que las RTM proveen una fuente sincronizada de sustratos para una óptima síntesis de proteína microbiana a nivel ruminal. Un factor que juega un papel determinante en la síntesis de proteína microbiana a nivel ruminal es el pH, pero en este trabajo no se observaron diferencias de valores de pH entre tratamientos (Pomiés, 2014), y además el promedio ($6,06 \pm 0,04$) se mantuvo por encima del valor crítico (6,0) a partir del cual se observa una reducción de la MOD y se vería comprometido el óptimo nivel de síntesis de proteína microbiana (Calsamiglia *et al.*, 2008). Bargo *et al.* (2002a) reportan que la síntesis de proteína microbiana a nivel ruminal no se vio afectada por los diferentes sistemas de alimentación, aunque este autor estimó dicha síntesis a partir de la relación alantoína/creatinina, atribuyéndole parte de la ausencia de diferencias a la falta de sensibilidad de la técnica.

En estudios *in vitro*, en sistemas de rúmenes artificiales de flujo continuo, Vibart *et al.* (2010), observaron de manera contraria a nuestros resultados, que a mayor proporción de pastura en la dieta, tanto la concentración de N proveniente de células microbianas como la cantidad de células microbianas aumenta. Sin embargo, Soder *et al.* (2013) no reportaron diferencias en el flujo de N microbiano al duodeno cuando compararon una dieta solamente a base de pasturas contra una dieta solamente a base de RTM. Vale comentar que en ambos trabajos las características relacionadas a la composición química del FF era superior en la mayoría de los aspectos a la de las RTM utilizadas.

A pesar de que los mayores flujos de N microbiano a duodeno en RTM100 y RTM75 sugieren que se podrían lograr mejores eficiencias de utilización de N para síntesis de proteína microbiana cuando se utiliza en la alimentación de vaca lechera solamente una RTM, respecto a pastura de alta calidad o una combinación de ambas, no se observaron diferencias entre tratamientos en la eficiencia de utilización del N de la dieta, ni de la MOD para la síntesis de N microbiano. Similares resultados se observaron en trabajos previos realizados por investigadores de nuestro grupo, que evaluaron la eficiencia de flujo de N microbiano en rumiantes alimentados con pastura templadas de alta calidad o pastura más suplementación con concentrados (Tebot *et al.*, 2012; Aguerre *et al.*, 2013).

La producción de leche alcanzada por los tratamientos con mayor porcentaje de RTM en la dieta (RTM100 y RTM75) fue aproximadamente un 8,5% superior que en RTM50. Este resultado es reflejo del mayor consumo de nutrientes, ya que ambos tratamientos consumieron dietas con mayor porcentaje de concentrados, lo que repercutió en dietas con mayor aporte energético que la dieta con mayor porcentaje de FF (RTM50). Estos resultados son consistentes con los reportados por varios autores (Kolver & Muller, 1998; Soriano *et al.*, 2001; NRC, 2001; Bargo *et al.*, 2002b; Vibart *et al.*, 2008; Mendoza *et al.*, 2016), quienes mencionan que la producción de leche a base de pasturas podría estar limitando el potencial productivo, principalmente por los bajos consumos alcanzados y a la baja concentración energética de los mismos.

La mayor producción de sólidos (grasa, proteínas y caseína total) en RTM100 y RTM75, se explica por la mayor producción de leche alcanzada en estos dos tratamientos respecto de RTM50, ya que a nivel composicional no se observan diferencias en los porcentajes para ninguno de estos tres componentes. La mayor

producción de grasa en los tratamientos con mayor porcentaje de RTM está en concordancia con lo reportado por varios autores (Bargo *et al.*, 2002b; Mendoza *et al.*, 2016; Morales-Almaráz *et al.*, 2010; Kolver & Muller, 1998; Schroeder *et al.*, 2005; Schroeder *et al.*, 2003), sin embargo Vibart *et al.* (2008) y Soriano *et al.* (2001), no observaron diferencias aún cuando la pastura ocupaba más del 30% de la dieta total. Asimismo la mayor producción de grasa es coherente con los mayores consumos de MS, ENL y FND alcanzados en esos tratamientos. No se observaron diferencias en el pH ruminal, así como tampoco tanto en la concentración de ácido acético a nivel ruminal entre los tres tratamientos (Pomiés, 2014); es sabido que el ácido acético es un precursor de la síntesis de grasa láctea y que si tanto el nivel de FDN o el pH están por debajo de los niveles óptimos, se generan una mayor proporción de AG trans a nivel ruminal quienes determinan una inhibición de la síntesis de grasa en la glándula mamaria (Bauman *et al.*, 2008). A pesar de que RTM100 y RTM75 son los tratamientos en los que hubo mayor consumo de concentrados, se logró mantener los niveles aceptables de producción de grasa, ya que la dieta total tenía niveles de FND superiores al 30% (nivel recomendado por el NRC, 2001) y un pH ruminal más estable (Pomiés, 2014); esto pudo haberse logrado en parte por la adición de sustancias buffer (bicarbonato de sodio) y alcalinizantes (óxido de magnesio) a la dieta.

La producción de proteínas en leche fue un 8,7% superior en RTM100 y RTM75 respecto a RTM50, lo que sería atribuible a la mayor producción de leche observada en estos tratamientos, debido al mayor consumo de MS y ENL, lo que dejaría disponible una mayor cantidad de aminoácidos para que ingresen en la vía de la síntesis de proteína láctea a nivel de la glándula mamaria. Este resultado es coincidente con lo reportado por varios autores (Bargo *et al.*, 2002b; Mendoza *et al.*, 2016; Schroeder *et al.*, 2005; Kolver & Muller, 1998 y Vibart *et al.*, 2008) utilizando pastura en avanzado estado de madurez. Sin embargo Morales-Almaráz *et al.* (2010), Soriano *et al.* (2001), Vibart *et al.* (2008) en el experimento 1, y Schroeder *et al.* (2003) no observaron diferencias en producción de proteínas en leche en los diferentes tratamientos. A nivel composicional, en su mayoría, estos autores no observaron diferencias entre tratamientos respecto a la composición, cuando la proteína es expresada como porcentaje al igual que en nuestro trabajo, salvo Kolver & Muller (1998), Schroeder *et al.* (2005) y Vibart *et al.* (2008) en el experimento 1, quienes observaron que a mayor porcentaje de pastura en la dieta menor es el porcentaje de proteína en la leche.

Los resultados obtenidos para producción de caseínas totales en leche están en acuerdo con los obtenidos para la producción de proteínas, ya que las caseínas constituyen la fracción más importante de las materias nitrogenadas en la leche (Farrell *et al.*, 2004), y en nuestro estudio las caseínas representaron en promedio el 72,3% de la proteína total sin diferencias entre tratamientos (EEM = 0,01). Estos resultados son coincidentes con los reportados por Mendoza *et al.* (2016) quienes observaron una mayor producción total de caseínas en los tratamientos con mayor producción de leche y de proteínas pero no encontraron diferencias en la relación caseína:proteína, la cual fue en promedio 76% para los 3 tratamientos.

La mayor producción de lactosa en la RTM100 y RTM75 también está explicada por la mayor producción de leche en estos tratamientos. Asimismo, la lactosa es el componente de la leche que es menos modificable a través de cambios en la dieta de los animales (Sutton, 1989) y además debido a su importante acción osmo-reguladora estaría jugando un importante papel en la determinación del volumen de leche producido (Jensen, 1995). Estos resultados coinciden en parte con los reportados por

Mendoza *et al.* (2016), quienes observaron una tendencia a que el tratamiento con 4 h de acceso a FF tuviera mayor producción de lactosa que el tratamiento con 8 h de acceso a FF.

El perfil de AG de la leche presentó características más saludables para los consumidores en RTM50, debido a que en este tratamiento fue donde se observó mayor contenido de AG linolénico, vaccénico y ruménico, este último con propiedades nutraceuticas entre las cuales podrían reducir la incidencia de cáncer (Elgersma *et al.* 2006). Este resultado es coincidente con lo reportado por varios autores (Mendoza *et al.*, 2016; Morales-Almaráz *et al.*, 2010; Vibart *et al.*, 2008; Bargo *et al.*, 2006; Schroeder *et al.*, 2005 y Schroeder *et al.*, 2003), quienes observaron que a medida que la pastura fresca sustituye a las RTM en la dieta de vacas lecheras, aumenta el contenido de ácido vaccénico y ruménico en la grasa láctea. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo podrían ser explicados porque para los animales asignados al tratamiento RTM50 el 47% del total de MS ingerida provino de FF, los que presentan altos contenidos de ácido linolénico (Chilliard *et al.*, 2000a). Tanto el ácido vaccénico como el ruménico son intermediarios en el proceso de hidrogenación del linolénico, con lo cual su acumulación en el rumen determina su presencia en la leche. En el caso del ruménico, la vía más importante de síntesis es a nivel de la glándula mamaria a partir del vaccénico (Chilliard *et al.*, 2000a) por acción de la $\Delta 9$ -desaturasa (Bauman *et al.*, 2008). Parte de del AG linolénico que escapa de la hidrogenación a nivel ruminal, si es absorbido a nivel intestinal posteriormente puede ser secretado en la leche, lo que explicaría su mayor contenido en RTM50.

El perfil de AG en RTM50 presentó un menor contenido de AG saturados, y mayor contenido de AG insaturados, principalmente debido al mayor contenido de AGMI, que en RTM100. Este resultado también es coincidente con varios autores (Mendoza *et al.*, 2016; Morales-Almaráz *et al.*, 2010; Vibart *et al.*, 2008; Bargo *et al.*, 2006; Schroeder *et al.*, 2005 y Schroeder *et al.*, 2003), quienes observaron que la inclusión de pasturas en la dieta aumenta disminuye el contenido de AG insaturados en la leche. Asimismo, RTM50 presentó mayor cantidad de AG pre-formados, lo cual es coincidente por lo reportado por Bargo *et al.* (2006), Moralez-Almaráz *et al.* (2010), Loores *et al.* (2003) y Mendoza *et al.* (2016). Este resultado podría estar explicado en parte a un incremento en la utilización en la síntesis de grasa láctea de los AG provenientes de la ingesta (Palmquist *et al.*, 1993).

La relación n-6:n-3 fue menor en RTM50 que en RTM75, y en éste a su vez fue menor que en RTM100. Este resultado sería debido al mayor consumo de AG linolénico proveniente de las pasturas en los tratamientos RTM50 y RTM75. A su vez es coincidente con lo reportado por Mendoza *et al.* (2016), quienes observaron que en vacas consumiendo una dieta RTM que tuvieron acceso por 8 h a FF, dicha relación fue menor que en vacas consumiendo exclusivamente una RTM.

La grasa láctea en RTM50 presentó un menor índice de aterogenicidad que RTM100, principalmente explicado por el mayor contenido de AG insaturados y principalmente al mayor contenido de AGMI, lo que es coincidente con lo reportado por Mendoza *et al.* (2016).

Tanto el MUN como el BUN fueron mayores en los tratamientos con mayor porcentaje de RTM, contrario a lo esperado, ya que debido a las características de las pasturas de

alta calidad anteriormente citadas hubiera sido esperable que a mayor porcentaje de forraje en la dieta mayor fuera el nivel de BUN y MUN. Sin embargo estos resultados son consistentes con el menor consumo de N aportado por la pastura, y probablemente a una mayor cantidad de proteína degradable en rumen en la RTM, lo que provocó una mayor concentración de BUN y MUN en RTM100 y RTM50, ya que los niveles de MUN y BUN presentan una alta correlación (Roseler *et al.*, 1993; Reynal & Broderick, 2005). De alguna manera, esta mayor degradación de la harina de soja a nivel ruminal se puede ver reflejada en los niveles de BUN para los tres tratamientos en las diferentes horas de muestreo, ya que se observa claramente en las curvas de la dinámica del BUN, dos picos coincidentes con las 2 sesiones más importantes de ingesta de RTM por parte de las vacas asignadas a los tres tratamientos (Pomiés, 2014).

Asimismo los valores de MUN observados están por encima del rango recomendado para vacas lecheras por Moore & Varga (1996) (10 a 15 mg/dl) y por Jonker *et al.* (1999) (10 a 16 mg/dl).

El mayor nivel de glucemia en RTM100 respecto de RTM50 es consistente con la mayor ingesta de CNF y con la mayor concentración de propionato a nivel ruminal en RTM100 respecto a RTM50 (32,4 y 27,2% respectivamente; EEM = 1,44) (Pomiés, 2014), lo que concuerda con lo reportado por Drackley *et al.* (2001), quienes sugieren que la tasa de conversión de propionato a glucosa es mayor en animales que consumen dietas con mayor nivel de concentrados respecto a los que consumen dietas con mayor cantidad de forrajes. No se observaron diferencias en los niveles de insulina en sangre entre tratamientos, a pesar de que la diferencia en los niveles de glucemia observados sugerirían encontrar mayores niveles de insulina en los tratamientos con mayor nivel de glucemia debido a que los mayores niveles de glucemia estimularían una mayor secreción de insulina. Esto fue reportado por Mendoza *et al.* (2012) y Delany *et al.* (2010), quienes observaron mayores valores de insulinemia para las vacas que consumen una dieta exclusiva a base de RTM con respecto a las que consumen RTM + pastura o pastura + concentrado.

En nuestro trabajo no se detectó efecto de la hora en el nivel de glucemia, lo que coincide con lo reportado por Mendoza *et al.* (2012). Este resultado está de acuerdo con lo señalado por Brokman (2005), respecto a que la glucemia en rumiantes no presenta variaciones significativas a lo largo del día, ya que se encuentra bajo una fuerte regulación de la neoglucogénesis. Sin embargo, en nuestro trabajo se observó efecto de la hora sobre el nivel de insulinemia, el cual aumentó progresivamente con el transcurso de las horas del día, para llegar a su máximo valor a la hora 12 del experimento (siendo la hora 0 en comienzo de la ingesta). Este resultado coincide por lo reportado por Mendoza *et al.* (2012) y está de acuerdo a lo reportado por Brokman (2005), quien menciona que el nivel de insulinemia aumenta en las horas posteriores al inicio de la ingesta como respuesta a la llegada de AGV producidos a nivel ruminal a la circulación portal. Este hecho se observa en los resultados obtenidos en este mismo ensayo, reportados por Pomiés (2014), quien observa que la concentración de AGV en rumen aumentan conforme transcurren las horas post ingesta de alimentos.

Con respecto a la eficiencia de utilización de la MS para producción de leche, no se observaron diferencias entre tratamientos en la eficiencia de utilización de la MS para la producción de leche. Este hecho es importante de destacar, ya que vacas de alta producción aún consumiendo hasta un 30% de FF logran mantener eficiencias de consumo similar a la de vacas alimentadas exclusivamente con una dieta a base de

RTM. Posiblemente esto se explique por los altos valores y la ausencia de diferencias en la digestibilidad aparente de la MS y MO consumida por los animales en los diferentes tratamientos.

La EUND y la EUED fueron superiores en RTM50 con respecto a RTM100 lo que es consistente con los resultados de consumo, digestibilidad y producción presentados en este trabajo. Con respecto al N, la alta digestibilidad de la fracción nitrogenada de los alimentos (78,9%; EEM= 2,02 Pomiés, 2014), el bajo tenor proteico de la pastura utilizada (PB=15%), y la mayor degradación a nivel ruminal de la proteína de la harina de soja constituyente de la RTM, son las posibles explicaciones del resultado obtenido de la EUND. Estos datos de EUND podrían ser considerados bajos para los tres tratamientos (28,6 %; 30,0 % y 31,6% para RTM100, RTM75 y RTM50 respectivamente; EEM 1,53), ya que Phuong *et al.* (2013) en un trabajo de meta-análisis que involucra a 68 estudios que reportan datos estadísticos de 306 dietas y producción de leche observaron que el promedio de la eficiencia de utilización de N es de 42,6%, con un mínimo de 29,2% y un máximo de 64,5%.

Con respecto a la EUED, la mayor eficiencia lograda en RTM50 respecto a RTM100 y RTM75 podría explicarse en parte a que si bien las primeras consumieron una menor cantidad de energía, también excretaron una menor cantidad de energía en leche. Asimismo RTM50 presentó el menor balance de energía (Pomiés, 2014). Estos resultados de EUED podrían considerarse como valores de eficiencia medio (29,8%; 31,5% y 32,2% para RTM100, RTM75 y RTM50 respectivamente; EEM= 1,15), ya que se encuentran muy cercanos al promedio reportado por Phuong *et al.* (2013) en el mismo trabajo de meta-análisis, donde observaron que el promedio de eficiencia de utilización de la energía es de 34,1% con un mínimo de 23,3% y un máximo de 44,9%.

11. CONCLUSIONES

Con la inclusión de hasta un 29 % raigrás en la dieta de vacas lecheras alimentadas con una ración totalmente mezclada es posible mantener los niveles de consumo de materia seca y materia orgánica sin afectar la producción de leche, así como tampoco el consumo de N, balance de N y el flujo de N microbiano al duodeno.

Hasta los niveles máximos de inclusión de raigrás evaluados en este trabajo (47% en base seca) no se detectaron diferencias en la digestión de la materia seca y de la materia orgánica, la eficiencia de utilización del N y de la materia orgánica digestible para síntesis de N microbiano a nivel ruminal, ni la eficiencia de utilización de la materia seca para producción de leche. Sin embargo, se produjo un descenso en el consumo de materia seca y producción de leche.

A través de la inclusión de forraje fresco se logró modificar el perfil de la grasa de la leche, produciendo un aumento de los ácidos Vaccénico, Ruménico y Linolénico, así como en el total de ácidos grasos insaturados, lo que volvería este producto un alimento más saludable para los consumidores.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. A.O.A.C., (1990). Official methods of analysis. 15th Ed. Association of Official Agricultural Chemists. Arlington VA.
2. A.O.A.C., (1995). Association of Official Analytical Chemist. Official Methods of analysis. 16th ed. AOAC, Arlington VA.
3. Aguerre M, Cajarville C, Machado V, Persak G, Brambillasca S, Repetto JL. (2009). Dry matter intake and digestibility of temperate pastures supplemented with sorghum grain in wethers and heifers. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 39 (Suppl. 1), p:251-255.
4. 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. *Anim. Feed Sci. Technol* 186: 12– 19.
5. Allen, MS. (1999). Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 83:1598-1624.
6. Bach A, Calsamiglia S, Stern M.D. (2005). Nitrogen metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 88:(E. Suppl.):E9–E21.
7. Baker LD, Ferguson JD, Chalupa W. (1995). Responses in urea and true protein of milk to different protein feeding schemes for dairy cows. *J. Dairy Sci.* 78:2424-2434.
8. Balcells, J., J. A. M. Guada, and M. Peiró. 1992. Simultaneous determination of 539 allantoin and oxypurines in biological fluids by high-performance liquid 540 chromatography. *J. Chromatography.* 575:153-157.
9. Bargo F, Delahoy JE, Schroeder GF, Baumgardc LH, Muller LD. (2006). Supplementing total mixed rations with pasture increase the content of conjugated linoleic acid in milk. *Anim Feed Sci Technol* 131: 226-240.
10. Bargo F, Muller L.D, Kolver E.S, Delahoy JE. (2003). Invited Review: Production and digestion of supplemented dairy cows on pasture. *J. Dairy Sci.* 86:1–42.
11. Bargo F, Muller LD, Kolver E.S, Delahoy JE, Cassidy TW. (2002a). Milk response to concentrate supplementation of high producing dairy cow grazing at two pasture allowances. *J. Dairy Sci.* 85:1777-1792.
12. Bargo F, Muller LD, Delahoy J.E, Cassidy TW. (2002b). Performance of high producing dairy cows with three different feeding systems combining pasture and total mixed rations. *J Dairy Sci* 85: 2948–2963.
13. Bauman DE, Griinari JM. (2001). Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. *Livest. Prod. Sci.* 70:15–29
14. Bauman DE, Perfield JW, Harvatine KJ, Baumgard LH. (2008). Regulation of fat synthesis by conjugated linoleic acid: Lactation and the ruminant model. *J. Nutr.* 138:403–409.
15. Beever DE, Doyle PT. (2007). Feed conversion efficiency as a key determinant of dairy herd performance: a review. *Aust. J. Exp. Agri.* 47:645–657.

16. Bell AW, Bauman DE. (1997). Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. *J Mamm Gland Biol Neopl.* 2:265-278.
17. Broderick GA, Stevenson MJ, Patton RA. (2009). Effect of dietary protein concentration and degradability on response to rumen-protected methionine in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92:2719-2728.
18. Broderick. G. A. (2003). Effects of Varying Dietary Protein and Energy Levels on the Production of Lactating Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 86:1370–1381.
19. Broderick GA, Clayton MK. (1997). A Statistical Evaluation of Animal and Nutritional Factors Influencing Concentrations of Milk Urea Nitrogen. *J. Dairy Sci.* 80:2964-2971.
20. Brockman RP, Laarveld B. (1986). Hormonal regulation of metabolism in ruminants; a review. *Livest. Prod. Sci.* 14:313-334.
21. Cajarville C, Aguerre M, Repetto JL. (2006). Ruminal pH, N-NH₃ concentration and forage degradation kinetics on cows grazing temperate pastures and supplemented with different sources of grain. *Anim Res*: 55: 1-11.
22. Cajarville, C., Mendoza, A., Santana, A., Repetto, J.L. (2012). En tiempos de intensificación productiva... ¿cuánto avanzamos en el conocimiento de los nuevos sistemas de alimentación de la vaca lechera? *Veterinaria.* 48:35-39.
23. Calsamiglia S, Cardozo PW, Ferret A, Bach A. (2008). Changes in rumen microbial fermentation are due to a combined effect of type of diet and pH. *J. Anim. Sci.* 86:702-711.
24. Chaudry AS. (2008). Forage based animal production systems and sustainability, an invited keynote. *R. Bras. Zootec.* 37 (Supl. E.): 78-84.
25. Chen XB, Gomes MJ. (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, AB2 9SB, UK.
26. Chilibraste P, Soca P, Mattiauda D. (2012). Estrategias de alimentación en Sistemas de Producción de Leche de base pastoril. En: *Pasturas 2012: Hacia una ganadería competitiva y sustentable*. Balcarce: INTA. pp. 91-100.
27. Chilibraste P, Battegazzore G. (2014). Informe anual del proyecto producción competitiva. Conaprole.
28. Chilliard Y, Ferlay A, Looor J, y Martin B. 2000. Trans and conjugated fatty acids in milk from cows and goats consuming pasture or receiving vegetable oils seed. *J. Anim. Sci.* 1:243-254.
29. Chilliard Y, Ferlay A, Mansbridge RM, Doreau M. (2000b). Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. *Ann. Zootech.* 49:181–205.
30. Chizzotti ML, Valadares Filho, SC, Valadares RFD, Chizzotti FHM, Tedeschi LO. (2008). Determination of creatinine excretion and evaluation of spot urine sampling in Holstein cattle. *Livest Sci* 113: 218-225.
31. Choi, B. R., and M. S. Allen. 1999. Intake regulation by volatile fatty acids and physical fill. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 29(ISRP):40–41(Abstr.).

32. Clark JH, Klusmeyer TH, Cameron MR. (1992). Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 75:2304-2323.
33. Coelho da Silva JF. (2011). Capítulo 3. Mecanismos reguladores de consumo. En *Nutrição de ruminantes*. Berchielli TT, Vaz Pirez A, de Oliveira SG. (2011). Segunda edição. Jaboticabal: Funep.
34. Cohen DC. (2001). Degradability of crude protein from clover herbage used in irrigated dairy production systems in northern Victoria. *Aust. J. Agric. Res.* 52:415-425.
35. Coppock CE, Bath DL, Harris B. (1981). From feeding to feeding systems. *J. Dairy Sci.* 64:1230-1249.
36. Delany KK, Macmillan KL, Grainger C, Thomson PC, Blache D, Nicholas KR. (2010). Blood plasma concentrations of metabolic hormones and glucose during extended lactation in grazing cows or cows fed a total mixed ration. *J. Dairy Sci.* 93:5913-5920.
37. Diario Oficial. (2000). Ordenanza sobre Uso de Animales en Experimentación, Docencia e Investigación. Dirección Nacional de Impresiones y Publicaciones Oficiales, Montevideo. Uruguay. Nº 25.467. 1440-C a 1444-C, pp: 64-68.
38. DIEA. (2013). Anuario estadístico agropecuario 2012. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Dirección de Estadísticas Agropecuarias, Uruguay. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,659,O,S,0,MNU;E;27;8;MNU;?> (fecha de consulta: 10/3/2013).
39. DIEA. (2016). Estadísticas del sector lácteo 2014. Serie Trabajos Especiales Nº 332. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Dirección de Estadísticas Agropecuarias, Uruguay. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/sistemas-de-produccion/lecheria/estad%C3%ADsticas-del-sector-l%C3%A1cteo-2014> (fecha consulta: 15/12/2016).
40. Dillon P. (2006). Achieving high dry-matter intake from pasture with grazing dairy cows. In: *Fresh herbage for dairy cattle* (Eds: Elgersma A, Tamminga S). Springer. Dordrecht, The Netherlands. pp: 1-26.
41. Dixon, R.M., Stockdale, C.R., 1999. Associative effects between forages and grains: consequences for feed utilization. *Aust. J. Agric. Res.* 50, 757-773.
42. Doyle, P. T., C. R. Stockdale, W. J. Wales, G. P. Walker, and J. W. Heard. (2001). Limits to and optimising of milk production and composition from pastures. *Recent Adv. Anim. Nutr. Aust.* 13:9-18.
43. Drackley JK, Overton TR, Douglas GN. (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.
44. Eastridge ML. (2006). Major advances in applied dairy cattle nutrition. *J. Dairy Sci.* 89:1311-1323.
45. Edmonson, A.J., Lean, I., Weaver, L.D., Farver, T., Webster, G. (1989). A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J Dairy Sci* 72: 68-78

46. Elgersma A, Tamminga S, Ellen G. (2006). Modifying milk composition through forage. *Anim Feed Sci Technol* 131: 207-225.
47. Emery R, Liesman J, Herdt T. (1992). Metabolism of long chain fatty acids by ruminant liver. *J. Nutr.* 122:832-837.
48. Farrell Jr. H.M., Jimenez-Flores R., Bleck G.T., Brown E.M., Butler J.E., Creamer L.K. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk - sixth revision. *J. Dairy Sci.* 87:1641-74.
49. Faverdin, P., and N. Bareille. 1999. Lipostatic regulation of feed intake in ruminants. Pages 89-102 in *Regulation of Feed Intake*. D. van der Heide, E. A. Huisman, E. Kanis, J. W. M. Osse, and M. W. A. Verstegen, ed. CAB International Publishing, Wallingford, UK.
50. Feng S, Lock AL, Garnsworthy PC. (2004). Technical Note: A Rapid Lipid Separation Method for Determining Fatty Acid Composition of Milk. *J. Dairy Sci.* 87:3785-3788.
51. Fontaneli R, Sollenberger L, Littell R, Staples CR. (2005). Performance of lactating dairy cows managed on pasture-based or in freestall barn-feeding systems. *J. Dairy Sci.* 88:1264-1276.
52. Forbes, J. M. (1996) Integration of regulatory signal controlling forage intake in ruminants. *J. Anim. Sci.* 74:3029-3035.
53. Garcia SC, Fulkerson WJ. (2005). Opportunities for future Australian dairy systems a review. *Aust. J. Exp. Agric.* 45:1041-1055.
54. Gill M. (1979). The principles and practice of feeding ruminants on complete diets. *Grass For Sci.* 34:155-161.
55. Griinari JM, Bauman DE. (1999). Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. Page 180 in *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*. Vol. 1. M. Yurawecz, M. Mossoba, J. Kramer, M. Pariza, and G. Nelson, eds. AOCS Press, Champaign, IL.
56. Groff EB., Wu Z. (2005). Milk production and nitrogen excretion of dairy cows fed different amounts of protein and varying proportions of alfalfa and corn silage. *J. Dairy Sci.* 88:3619-3632.
57. Hall MB, Huntington GB. (2008). Nutrient synchrony: Sound in theory, elusive in practice. *J. Anim. Sci.* 86:E287-E292.
58. Hanson GD, Cunningham LC, Morehart MJ, Parsons RI. (1998). Profitability of moderate intensive grazing of dairy cows in the Northeast. *J. Dairy Sci.* 81:821-829.
59. Herrera-Saldana R, Gomez-Alarcon R, Torabi M, Huber JT. (1990). Influence of synchronizing protein and starch degradation in the rumen on nutrient utilization and microbial protein synthesis. *J. Dairy Sci.* 73:142-148.
60. Hoekstra NJ, Schulte RPO, Struik PC, Lantinga EA. (2007). Pathways to improving the N efficiency of grazing bovines. *Eur. J. Agron.* 26:363-374.
61. Hoover WH. (1986). Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *J. Dairy Sci.* 69:2755-2766.

62. Huhtanen, P., Kaustell, K., Jaakkola, S. (1994). The use of internal markers to predict total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. *Anim Feed Sci Technol* 48: 211-227
63. Huntington GB, Harmon DL, Richards CJ. (2006). Sites, rates, and limits of starch digestion and glucose metabolism in growing cattle. *J. Anim. Sci.* 84(E. Suppl.):E14–E24.
64. Ipharraguerre IR, Clark JH. (2005). Impacts of the source and amount of crude protein on the intestinal supply of nitrogen fractions and performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88:22-37.
65. Jensen RG. (1995). Handboock of milk composition. Academic press published by Elsevier Inc. A Harcourt Science and Technology Company.
66. Jonker JS, Kohn RA, Erdman RA. (1999). Milk urea nitrogen target concentrations for lactating dairy cows fed according to national reserch council recomendation. *J. Dairy Sci.* 82:1261–1273
67. Kaps M, Lamberson WR. (2007). Biostatistics for animal science. CABI Publishing. Wallingford, UK. 445 p.
68. Kelley NS, Hubbard NE, Erickson KL. 2007. Conjugated linoleic acid isomers and cancer. *J. Nutr.* 137:2599-2607.
69. Kennedy E., McEvoy M., Murphy JP., O'Donovan M. (2009). Effect of restricted acces time to pasture on dairy cow milk production grazing behavior, and dry matter intake. *J. Dairy Sci.* 92:168-176.
70. Kelsey, JA., Corl BA., Collier RJ., Bauman DE. (2003). The effect of breed, parity, and stage of lactation on conjugated linoleic acid (CLA) in milk fat from dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:2588–2597.
71. Khalili, H., Sairanen, A. (2000). Effect of concentrate type on rumen fermentation and milk production of cows at pasture. *Anim. Feed Sci. Technol.* 84: 199.
72. Kolver, E.S. (2003). Nutritional limitations to increased production on pasture-based systems. *Proc Nut Soc* 62: 291–300.
73. Kolver ES, Muller LD. (1998). Performance and nutrient intake of high producing Holstein cows consuming pasture or a total mixed ration. *J. Dairy Sci.* 81:1403–1411.
74. Kozloski GV. (2011). Bioquímica dos ruminantes. 3ª edição. UFSM. Santa Maria. RS. 212p.
75. Leaver, J. D. 1985. Milk production from grazed temperate grassland. *J. Dairy Res.* 52:313–344.
76. Lefier D. 1996. Analytical methods for the determination of the urea content in milk. *Bull. IDF.* 315: 35-38.
77. Leonardi, C., Stevenson, M. Armentano. L. E. (2003). Effect of two levels of crude protein and methionine supplementation on performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:4033–4042
78. Licitra G, Hernandez TM, Van Soest PJ. (1996). Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Anim Feed Sci Technol* 57:347-358.

79. Lóor JJ., Soriano FD., Lin X., Herbein JH., Polan CE. (2003). Grazing allowance after the morning or afternoon milking for lactating cows fed a total mixed ration (TMR) enhances trans11-18:1 and cis9,trans11-18:2 (rumenic acid) in milk fat to different extents. *Animal Feed Science and Technology*.109:105-119.
80. Mendoza A., Cajarville C., Repetto JL. (2016). Short communication: Intake, milk production, and milk fatty acid profile of dairy cows fed diets combining fresh forage with a total mixed ration. *J. Dairy Sci.* 99:1-7
81. Mendoza A, Cajarville C, Félix A, Pérez-Ruchel A, Duvos M, Iriarte AI, Machiavello N, Repetto JL. (2012). Concentración plasmática de insulina, glucosa y urea en vacas lecheras alimentadas con forraje fresco y ración totalmente mezclada. *Veterinaria (Montevideo)* 48 (Supl 1):150.
82. Mendoza A, La Manna A, Crespi D, Crowe MA, Cavestany D. (2008). Whole sunflower seeds as a source of polyunsaturated fatty acids for grazing dairy cows: Effects on metabolic profiles and resumption of postpartum ovarian cyclicity. *Livest Sci* 119:183-193.
83. Merchen, NR. (1993). Digestion, absorption and excretion in ruminants. In: *The Ruminant Animal. Digestive Physiology and Nutrition* (Ed: Church DC), Waveland Press. Prospect Heights, Illinois, USA. pp. 172-201.
84. Mertens, DR. (1994). Regulation of forage intake. Pages 450– 493 in *Forage Quality, Evaluation, and Utilization*, G. C. Fahey, Jr, M. Collins, D. R. Mertens, and L. E. Moser, ed., American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, Madison, WI.
85. Moore DA & Varga G 1996 BUN and MUN: Urea nitrogen testing in dairy cattle. *Compendium Continuing Education Veterinary* 18:712–721
86. Morales-Almaraz E, Soldado A, Gonzalez A, Martínez-Fernández A, Domínguez-Vara I, de la Roza-Delgado B, Vicente F. (2010). Improving the fatty acid profile of dairy cow milk by combining grazing with feeding of total mixed ration. *J. Dairy Res.* 77:225–230.
87. Nápoli, G.M., Santini, F.J. (1988a). Suplementación energético-proteica de forrajes frescos en condiciones de pastoreo: I. Efecto sobre el medio ambiente ruminal y la degradabilidad proteica. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 8 (1):39
88. Nápoli GM, Santini FJ. (1988b). Suplementación energético-proteica de forrajes frescos en condiciones de pastoreo: II. Efecto sobre la digestión ruminal de la fibra. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 8 (1):40
89. Nocek JE, Russell JB. (1988). Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial protein synthesis and milk production. *J. Dairy Sci.* 71:2070–2107.
90. National Research Council. (1989). *Nutrient requirements of Dairy Cattle*. 6th revised edition. National Academy Sci., Washington, DC., USA
91. National Research Council. (2001). *Nutrient requirements of dairy cattle*. 7th revised edition. National Academy Press. Washington D.C., USA. 381 p.
92. Olmos-Colmenero JJ., Broderick GA. (2006). Effect of crude protein concentration on milk production and nitrogen utilization in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89:1704-1712.

93. Oltner R, Wiktorsson H. (1983). Urea concentrations in milk and blood as influenced by feeding varying amounts of protein and energy to dairy cows. *Livest Prod. Sci.* 10:457-467.
94. Palmquist D.L., Beaulieu A.D., Barbano D. M. (1993). ADSA foundation symposium: Milk fat synthesis and modification. Feed and animal factors influencing milk fat composition. *J. Dairy Sci.* 76:1753.
95. Pérez-Prieto LA, Delagarde R. (2013). Meta-analysis of the effect of pasture allowance on pasture intake, milk production, and grazing behavior of dairy cows grazing temperate grasslands. *J. Dairy Sci.* 96:6671-6689.
96. Phoung H.N., Friggens N.C., de Boer I.J.M., Schmidely P. (2013). Factors affecting energy and nitrogen efficiency of dairy cows: A meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 96:7245-7259.
97. Pomiés N. (2014). Combinación de diferentes niveles de forraje fresco y ración totalmente mezclada en dietas de vacas lecheras: efecto sobre el aprovechamiento digestivo. Tesis de Maestría en Producción Animal. Universidad de la República – Facultad de Veterinaria. Montevideo-Uruguay.
98. Relling A.E., Mattioli G.A. (2003). Absorción y destino metabólico de los nutrientes. En: Relling AE, Mattioli GA. *Fisiología Digestiva y Metabólica de los Rumiantes*. Ed EDULP, La Plata, Argentina. Cap 4, pp.44-71.
99. Repetto JL. (2011). La inclusión de pasturas frescas de calidad en la dieta de vacas lechera. III Simposio Regional da cadeia produtiva da leite. Palmeiras das Missoes. Brasil.
100. Repetto JL, Aguerre M, Alonso M, Curbelo A, Errandonea N, Cajarville C. (2001). Concentración de amoníaco ruminal en vacas a pastoreo, suplementadas con distintos granos. VII Congreso Nacional de Veterinaria. Montevideo, noviembre 2001.
101. Repetto JL, Cajarville C, D'alessandro J, Curbelo A, Soto C, Garín D. (2005). Effect of wilting and ensiling on ruminal degradability of temperate grass and legume mixtures. *Anim Res* 54:73-80.
102. Reynal SM., Broderick GA. (2005). Effect of dietary level of rumen-degraded protein on production and nitrogen metabolism in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88:4045-4064
103. Robertson JB, Van Soest PJ. (1981). The detergent system of analysis and its application to human foods. En: *The analysis of dietary fiber in food*. Ed. WPT James, O. Theander, M. Dekker. N.Y.
104. Roseler DK, Ferguson JD, Sniffen CJ, Herrema J. (1993). Dietary protein degradability effects on plasma and milk urea nitrogen and milk nonprotein nitrogen in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 76:525-534.
105. Rushen J, de Passillé AM, von Keyserlingk MAG, Weary DM. (2008). Housing for adult cattle. In: *The welfare of cattle*. Springer. Amsterdam, Netherlands. pp 142-180.
106. SAS. 2002. Statistical Analysis Systems Institute. SAS Version 9. SAS.
107. Schroeder GF, Couderc JJ, Bargo F, Rearte DH. (2005). Milk production and fatty acid profile of milk fat by dairy cows fed a winter oats (*Avena sativa* L.) pasture only or a total mixed ration. *New Zeal J Agric Res* 48:187–195.

108. Schroeder GF, Delahoy JE, Vidaurreta I, Bargo F, Gagliostro GA, Muller LD. (2003). Milk Fatty Acid Composition of Cows Fed a Total Mixed Ration or Pasture Plus Concentrates Replacing Corn with Fat. *J. Dairy Sci.* 86:3237-3248.
109. Sniffen CJ., O'Connor JD., Van Soest PJ., Fox Dg., Russel JB. (1992). A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *J. Anim. Sci.* 70:3562-3577.
110. Soder KJ, Muller LD. (2007). Case study: Use of Partial Total Mixed Rations on Pasture-Based Dairy Farms in Pennsylvania and New York. *Prof. Anim. Sci.* 23:300–307.
111. Soriano FD, Polan CE, Miller CN. (2001). Supplementing pasture to lactating Holsteins fed a total mixed ration diet. *J. Dairy Sci.* 84:2460–2468.
112. Stockdale CR. (2000a). Levels of pasture substitution when concentrates are fed to grazing dairy cows in northern Victoria. *Aust. J. Exp. Agric.* 40:913–921.
113. Stockdale CR. (2000b). Differences in body condition and body size affect the responses of grazing dairy cows to high-energy supplements in early lactation. *Aust. J. Exp. Agric.* 40:903–911.
114. Tebot I, Cajarville C, Repetto JL, 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.
115. Tucker WB, Rude BJ, Wittayakun S. (2001). Case study: Performance and economics of dairy cows fed a corn silage-based total mixed ration or grazing annual ryegrass during mid to late lactation. *Prof. Anim. Sci.* 17:195-201.
116. Tyrrell HF, Reid JT. (1965). Prediction of the energy value of cow's milk. *J. Dairy Sci.* 48:1215–1223.
117. Ulbricht, TLV., Southgate DAT. (1991). Coronary heart disease: seven dietary factors. *Lancet* 338:985–992.
118. Valadares RFD, Broderick GA, Valadares Filho SC, Clayton MK. (1999). Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. *J. Dairy Sci.* 82:2686-2696.
119. Van Soest PJ. (1994) Nutritional Ecology of the ruminant. 2nd Edition. Cornell University Press, Ithaca.
120. Van Vuuren, A.M., Van Den Pol-Van Dasselaar. (2006). Grazing systems and feed supplementation in Fresh Herbage for Dairy Cattle A. Elgersma, J. Dijkstra S. Tamminga (eds.), Springer, Netherlands pp 85-101.
121. Vázquez OP, Smith TR. (2000). Factors Affecting Pasture Intake and Total Dry Matter Intake in Grazing Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 83:2301–2309.
122. Vibart RE., Burns JC., Fellner V. (2010). Effect of replacing total mixed ration with pasture on ruminal fermentation. *Professional Animal Scientist.* 26:435-442.
123. Vibart RE, Fellner V, Burns JC, Huntington JB, Green JT. (2008). Performance of lactating dairy cows fed varying levels of total mixed ration and pasture. *J. Dairy Res.* 75: 471–480.

124. Wales WJ, Marret LC, Greenwood JS, Wright MM, Thornhill JB, Jacobs JL, Ho CKM, Auldish MJ. (2013). Use of partial mixed rations in pasture based dairying in temperature regions of Australia. *Anim. Prod. Sci.* 53:1167-1178.
125. White SL, Bertrand JA, Wade MR, Washburn SP, Green JT Jr, Jenkins TC. (2001). Comparison of Fatty Acid Content of Milk from Jersey and Holstein Cows Consuming Pasture or a Total Mixed Ration. *J. Dairy Sci.* 84:2295-2301.
126. Yemm EW, Willis AJ. (1954). The estimation of carbohydrates in plant extract by anthrone. *Biochem J.* 57:508.