



UNIVERSIDAD  
DE LA REPUBLICA  
URUGUAY



Facultad de Veterinaria  
Universidad de la República  
Uruguay

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**ACIDOSIS RUMINAL SUBAGUDA EN NOVILLOS EN  
ENGORDE: EFECTO DEL AYUNO Y LA REALIMENTACIÓN**

**ANA VIRGINIA RABAZA MARTÍNEZ**

**TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL**

**URUGUAY  
2016**





UNIVERSIDAD  
DE LA REPUBLICA  
URUGUAY



Facultad de Veterinaria  
Universidad de la República  
Uruguay

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**ACIDOSIS RUMINAL SUBAGUDA EN NOVILLOS DE EN  
ENGORDE: EFECTO DEL AYUNO Y LA REALIMENTACIÓN**

**ANA VIRGINIA RABAZA MARTÍNEZ**

**Georget Banchemo, DMV. PhD.**

**Director de Tesis**

**Martín Fraga, Lic. PhD.**

**Co-director**

**Cecilia Cajarville, DCTV. PhD.**

**Co-director**

**José Luis Repetto, DCTV. PhD.**

**Co-director**

**2016**

**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE  
DEFENSA DE TESIS**

**María De Jesús Marichal**

Facultad de Agronomía

Universidad de la República – Uruguay

**Verónica Ciganda**

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria - Uruguay

**Franklin Riet-Correa**

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria - Uruguay

Colonia del Sacramento, 28 de setiembre de 2016

# ACTA DE DEFENSA DE TESIS

## ACTA DE EXAMEN

**CURSO:** Defensa de Tesis de Maestría

**LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA:** Colonia, 28 de setiembre de 2016

**TRIBUNAL:** Dres. María de Jesús Marichal (Presidente), Verónica Ciganda, Franklin Riet-Correa

CI ESTUDIANTE	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
4.607.324-9	RABAZA MARTÍNEZ, Ana Virginia	S S S	12

PRESENTADOS	NO PRESENTADOS	APROBADOS	APLAZADOS	INSCRIPTOS
1	0	1	0	1

**TRIBUNAL**

**FIRMA**

Dra. María de Jesús Marichal (Presidente)

Dra. Verónica Ciganda

Dr. Franklin Riet-Correa



**NOTA:** La calificación mínima para aprobar el examen es B.B.B (6)

**-Opciones posibles de calificación: B.B.B. (6) o S.S.S. (12)**

# **INFORME DE TRIBUNAL**

## DEDICATORIA

*A mi abuelo Rabaza de quien aprendí el valor de la constancia  
y el esfuerzo. A la Chingola que sé aún sigue ahí.  
A mis cachorros Juan Ignacio, Santino y Tomás.  
A Pablo, mi compañero, compinche y amor.*

## AGRADECIMIENTOS

A mis tutores Goergget, Cecilia, Martín y Joselo, por su apoyo en las diferentes etapas del trabajo. Especialmente a Martín que pasó de ser mi compañero de oficina a parte fundamental de este proyecto.

A Inés Rosas, Rosina Da Rosa, María José Antúnez, Álvaro Aguirregaray, Agustín Carrocio, Agustín Chiesa y Juan Pablo Cappellini por su ayuda y dedicación durante la fase experimental.

A Marcelo Pla por sus valiosas contribuciones y sugerencias durante el trabajo en la Unidad de Lechería de INIA La Estanzuela.

A barraca Erro por la colaboración brindada.

A los funcionarios de las unidades de Lechería, Ganadería, Ovinos y al personal del Laboratorios de Suelos y Agua de INIA La Estanzuela por su colaboración.

A todo el equipo de los Departamentos de Nutrición y Bovinos de Facultad de Veterinaria: Germán Antúnez, Analía Pérez-Ruchel, Alejandro Britos, Alejandro Mendoza, Sebastián Brambillasca, Álvaro Santana y Carolina Fiol. Por la gran ayuda en el laboratorio y la buena disposición a cada momento.

A mis compañeros de esta etapa académica: Sofía Stirling, Gonzalo Fernández, Sebastián Basantes, Sebastián de Trinidad, Claudio Pozo y Alsiane Capelleso.

A las funcionarias de la biblioteca de INIA La Estanzuela, Graciela Villa, Alejandra Díaz y Anabela Domeniguni, por cumplir con cada solicitud realizada y por ampliar cada búsqueda de excelente manera. También a las funcionarias de biblioteca y hemeroteca de Facultad de Veterinaria, UdelaR.

Al Ing. Agr. Fernando Baldi por su apoyo en el análisis estadístico de los datos y al Ing. Agr. Alejandro La Manna por la formulación de la dieta empleada. A los doctores Gretel Ruprecht y Pedro Martino por su ayuda en la interpretación de indicadores de inflamación y resultados de funcional hepático.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por la beca de maestría nacional otorgada (POS\_NAC\_2014\_1\_102200) y el financiamiento del proyecto a través del fondo sectorial Innovagro (FSA\_1\_2013\_1\_12990).

A mi familia por entender tantas horas de ausencia.

A todos aquellos que de alguna manera colaboraron en la realización de este trabajo.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1. RESUMEN</b> .....	vi
<b>2. SUMMARY</b> .....	viii
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>4. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS</b> .....	4
<b>4.1 PÉRDIDAS EN ENCIERROS DE ENGORDE</b> .....	4
<b>4.2 ECOLOGÍA RUMINAL</b> .....	6
<b>4.3 ACIDOSIS LÁCTICA RUMINAL Y ACIDOSIS RUMINAL     SUBAGUDA</b> .....	7
<b>4.4 AMBIENTE Y FERMENTACIÓN RUMINAL</b> .....	10
4.4.1 ACOSTUMBRAMIENTO A LA DIETA .....	14
<b>4.5 RUMIA Y ROL DE LA SALIVA</b> .....	14
<b>4.6 AYUNO EN SISTEMAS DE ENGORDE</b> .....	16
<b>4.7 MICROBIOTA RUMINAL</b> .....	17
<b>4.8 RESPUESTA INFLAMATORIA</b> .....	18
4.8.1 FUNCIONAL HEPÁTICO .....	19
<b>4.9 MODELOS DE INDUCCIÓN EXPERIMENTAL DE ACIDOSIS</b> .....	22
<b>5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	27
<b>6. HIPÓTESIS</b> .....	29
<b>7. OBJETIVOS</b> .....	29
7.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>8. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN</b> .....	29
<b>9. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	30
<b>9.1 ANIMALES Y CONDICIONES DE ALOJAMIENTO</b> .....	30
<b>9.2 EXPERIMENTO</b> .....	30
<b>9.3 DETERMINACIONES</b> .....	33
9.3.1 CONSUMO DE ALIMENTO .....	33
9.3.2 COMPORTAMIENTO ANIMAL .....	33
9.3.2.1. <i>Comportamiento ingestivo</i> .....	33
9.3.2.2. <i>Ritmo de ingestión</i> .....	34
9.3.3 AMBIENTE RUMINAL .....	34
9.3.3.1. <i>pH ruminal, AGV y N-NH<sub>3</sub></i> .....	34
9.3.4 HORMONAS, METABOLITOS Y ENZIMOGRAMA HEPÁTICO.....	35
<b>9.4 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	36

<b>10. RESULTADOS</b> .....	39
<b>10.1 COMPORTAMIENTO INGESTIVO Y RITMO DE INGESTIÓN</b> .....	39
<b>10.2 EVOLUCIÓN DE pH RUMINAL, AGV, ÁCIDO LÁCTICO Y N-NH<sub>3</sub></b> 41	
<b>10.3 EVOLUCIÓN DE HORMONAS Y METABOLITOS</b> .....	47
<b>10.4 EVOLUCIÓN DE HAPTOGLOBINA Y FUNCIONAL HEPÁTICO</b> ...	50
<b>11. DISCUSIÓN</b> .....	54
<b>12. CONCLUSIONES E IMPLICANCIAS</b> .....	69
<b>13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	70

## LISTADO DE ABREVIATURAS

Las siguientes abreviaturas de términos se han utilizado a lo largo de la tesis y se definen en el primer uso en cada sección.

<b>AGNE:</b>	Ácidos grasos no esterificados
<b>AGV:</b>	Ácidos grasos volátiles
<b>ALP:</b>	Fosfatasa alcalina
<b>ALT:</b>	Alanina transaminasa
<b>CMS:</b>	Consumo de materia seca
<b>CV:</b>	Coeficiente de variación
<b>EM:</b>	Energía metabolizable
<b>ESM:</b>	Error estándar de la media
<b>FAD:</b>	Fibra ácido detergente
<b>FND:</b>	Fibra neutro detergente
<b>GGT:</b>	Gamma glutamil transpeptidasa
<b>GOT-AST:</b>	Transaminasa glutámico-oxalacética o aspartato aminotransferasa
<b>Hp:</b>	Haptoglobina
<b>LPS:</b>	Lipopolisacáridos
<b>MS:</b>	Materia seca
<b>N-NH<sub>3</sub>:</b>	Nitrógeno amoniacal
<b>PPA:</b>	Proteínas de fase aguda
<b>PV:</b>	Peso vivo
<b>SAA:</b>	Amiloide sérico A
<b>SARA:</b>	Acidosis ruminal subaguda
<b>TMR:</b>	Ración totalmente mezclada

## 1. RESUMEN

En sistemas de producción intensiva de carne son frecuentes las situaciones que impiden el acceso de los animales a la comida. Factores como imprevistos en los equipos de alimentación, presencia de clima adverso, dificultades en el desplazamiento de los animales, movimiento del ganado fuera de los corrales, presencia de animales dominantes y mártires facilitado por la jerarquía social que se establece en lotes heterogéneos dentro de un mismo corral, pueden provocar horas de ayuno. Factores que determinan que los animales coman de forma irregular pueden asociarse con una mayor incidencia de acidosis ruminal subaguda (SARA). A nivel nacional aún no se conoce la incidencia de SARA, pero se estima que su prevalencia es elevada conociendo el alto porcentaje de aparición de la forma clínica de esta patología. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto del ayuno sobre la aparición de SARA en bovinos en sistemas de engorde a corral en la etapa de terminación. Se realizó un experimento *in vivo* con un diseño completamente al azar, con medidas repetidas en el tiempo sobre las mismas unidades experimentales. Se utilizaron 20 novillos Hereford de 18-24 meses y  $379,4 \pm 6,4$  kg PV, alojados individualmente en encierros a cielo abierto, con una dieta totalmente mezclada (TMR) (85% concentrado). Los animales contaron con un catéter ruminal permanente y fueron asignados aleatoriamente a unos de los cuatro tratamientos que consistieron en la aplicación de un período de ayuno (horas de restricción absoluta al alimento) de diferente magnitud en un único momento del engorde seguido de realimentación; Control (C): sin ayuno; T12: ayuno por 12 horas; T24: ayuno por 24 horas y T36: ayuno por 36 horas. Se analizó el efecto de la magnitud del ayuno como modelo inductor de SARA, siguiendo tres evaluaciones: el comportamiento animal, el ambiente ruminal y el estado endócrino-metabólico. El modelo ayuno-realimentación logró reproducir experimentalmente ambos tipos de acidosis. La presencia de ayuno determinó valores de pH compatibles con cuadros de acidosis ruminal subaguda en los tratamientos sometidos a ayuno de 12 horas y 24 horas y acidosis ruminal aguda en el tratamiento de 36 horas de ayuno. Concentraciones intra-ruminales elevadas de ácido láctico (32,0-51,0 mmol/L) no determinaron sintomatología clínica de acidosis ruminal, lo que permitiría interpretar que la concentración de este ácido no es determinante para la expresión clínica de la enfermedad. El ayuno de 12 horas en animales en etapa final de engorde no causó un patrón bioquímico compatible con un balance energético negativo, como sí pudo observarse en los animales sometidos a ayuno de 24 ó 36 horas. La evaluación conjunta de Haptoglobina (Hp) en suero y los cambios de pH ruminal durante la

inducción de SARA permitieron comprobar experimentalmente la utilidad de Hp como marcador de esta enfermedad en etapas tempranas y en ausencia de signos clínicos manifiestos. Se realizó la reproducción experimental de SARA mediante un nuevo modelo inductor de la enfermedad, representando el primer abordaje mediante la aplicación de restricción absoluta al alimento, sin cambios cualitativos ni cuantitativos de la dieta.

## 2. SUMMARY

Situations that prevent animal access to food are common in intensive beef production systems. Contingencies in feeding equipment, presence of adverse weather, difficulties in animals' movement, livestock movement outside the pens, presence of dominant animals and martyrs facilitated by social hierarchy established in heterogeneous lots, each of these factors may cause hours of fasting. The management practices which determine that animals eat in an irregular way may be associated with a higher subacute ruminal acidosis (SARA) incidence. Under national conditions the incidence of SARA is still unknown, but it is estimated that its prevalence is high, taking into account the high percentage of appearance of the clinical form of the disease. This work aimed to evaluate the effect of fasting on the appearance of SARA in cattle in feedlot systems in the fattening stage. An *in vivo* experiment with a completely randomized design with repeated measurements over time on the same experimental units was carried out. 20 Hereford steers, 18-24 months and  $379.4 \pm 6.4$  kg BW, housed individually and fed with a total mixed diet (TMR) (85 % concentrate), were used. The animals had a permanent ruminal catheter and were randomly assigned to one of the four treatments, which consisted of applying a fasting period (hours of absolute food restriction) of different magnitude in one moment during the fattening period and followed by refeeding; Control (C): no-fasted animals; T12: animals fasted for 12 hours; T24: animals fasted for 24 hours and T36: animals fasted for 36 hours. The role of the magnitude of fasting as an inducer of SARA model was analyzed, following three evaluations, animal behavior, ruminal environment and endocrine - metabolic animal state. Fast-refeeding model achieved the experimental reproduction of both types of acidosis. Starvation determined pH values compatible with subacute ruminal acidosis in animals which fasted during 12 hours and 24 hours' treatments; and acute ruminal acidosis in 36 hours of fasting treatment. High intra-ruminal lactic acid concentrations (32.0 to 51.0 mmol/L) determined no clinical symptoms of ruminal acidosis, which would imply that the concentration of this acid is not decisive for the clinical expression of the disease. The 12-hour starvation treatment applied on animals in the final fattening stage did not cause a biochemical pattern compatible with a negative energy balance, in contrast with the patterns shown by animals with 24 or 36 hours of starvation. The evaluation of serum haptoglobin (Hp) and ruminal pH changes during induction of SARA enabled to prove experimentally the usefulness of Hp as a marker in early stages of the disease and in the absence of clinical signs. The experimental reproduction of SARA was performed using a new inductor model of the disease. This trial represents the first approach by applying absolute food restriction, without qualitative or quantitative diet changes.

### 3. INTRODUCCIÓN

La ganadería de Uruguay ha cambiado de manera notoria en los últimos años, donde una proporción de los sistemas íntegramente pastoriles ha sido reemplazada por sistemas de tipo más intensivos, los encierres a corral. Más del 10% de los animales faenados en Uruguay durante el año 2013 provinieron de encierros comerciales (Banchero et al. 2016). Estos establecimientos se asocian fuertemente con patologías propias de la intensificación de la producción animal, fundamentalmente tecnopatías vinculadas al tipo de dieta usado, a la alta densidad con la que se manejan los animales y a problemas de manejo. Relevamientos han evidenciado que el promedio mensual de mortalidad en los encierros de engorde comercial en EE.UU y Canadá asciende al 0,27% (Vogel y Parrot, 1994). Al tiempo que, según registros oficiales, la tasa de morbilidad en EE.UU llega a 5% y 11% (Smith, 1996). Si bien no existen datos más recientes publicados, se estima que las tasas de morbilidad y mortalidad en los corrales de engorde de EE.UU no ha disminuido (Edwards, 2010). En EE.UU las patologías respiratorias han sido identificadas como responsables del 70%-80% de la morbilidad (Smith, 1998) y del 44%-67% de la mortalidad (Gagea et al. 2006), mientras que en Canadá causan el 10%-66% de las muertes (Gagea et al. 2006). En la actualidad, este trastorno sigue siendo la causa más común de pérdidas por mortalidad y morbilidad en el ganado de feedlot en EE.UU (NAHMS, 2013). La industria de engorde de ganado estadounidense ha lidiado con la problemática de las enfermedades respiratorias durante décadas, representando éste el trastorno más devastador (Edwards, 2010; Hilton 2014; Holman et al. 2015), al contribuir con pérdidas económica significativas en el rendimiento productivo y calidad de la canal (Engler et al. 2014). En segundo lugar dentro de la incidencia de patologías, y con menor relevancia se ubican los desórdenes digestivos (3% a 7%) (Smith, 1996). En la región, la mortalidad de los sistemas de engorde de Argentina fluctúa entre el 1,0% y el 2,0%, y de forma similar a lo que sucede en EE.UU, las enfermedades respiratorias juegan un rol preponderante siendo los trastornos respiratorios los responsables de más de la mitad de las muertes (Giraud et al. 2008). Estos países, coincidentemente, emplean animales jóvenes como insumo de los sistemas de engorde, terneros en etapa de destete provenientes de sistemas pastoriles.

En una caracterización de los encierros uruguayos realizada en el año 2013, se pudo ver que los principales problemas sanitarios difieren de los que se producen en los sistemas de confinamiento de otros países (Banchero et al. 2016). El promedio de mortalidad registrado en ese estudio fue de 0,43% con un rango que osciló entre

0,02% y 1,0%. Dentro de estas pérdidas la acidosis junto a los problemas podales y las enfermedades clostridiales fueron identificados como importantes en al menos uno de cada cuatro engordes de un total de 71 establecimientos consultados. La acidosis clínica fue identificada como responsable del 44% de las muertes, representando el 34,3% de los casos clínicos reportados, mientras que las enfermedades respiratorias ascendieron sólo al 10%. Claramente las etiologías más importantes a nivel local son diferentes de las encontradas en otros encierros del mundo, y esta singularidad se atribuye a que Uruguay confina otro tipo de categoría de animales. En nuestro país, se utilizan mayormente animales adultos de entre uno a tres años, los cuales ingresan al engorde con más de 350 kg de peso vivo hasta alcanzar el peso de faena que ronda los 550 kg. A juzgar por los datos disponibles hasta el momento, se puede concluir que, en los sistemas de engorde a corral de Uruguay la mayoría de los problemas sanitarios derivan fundamentalmente de la alimentación.

Se estima que, por cada animal con acidosis clínicamente manifiesta, coexisten cerca de 100 casos de acidosis ruminal subaguda (SARA) (T.G. Nagaraja comunicación personal) que pasan desapercibidos ya que su diagnóstico es dificultoso por presentar signos clínicos sutiles. Si bien ambas formas de acidosis pueden causar pérdidas económicas significativas (Nocek, 1997), las pérdidas subclínicas del ganado pueden llegar a costar más que los trastornos clínicos (Smith, 1998). Bajo condiciones nacionales aún no se ha cuantificado con exactitud la incidencia ni las pérdidas económicas que representa la acidosis ruminal subaguda, pero se estima que provoca un gran impacto económico conociendo el alto porcentaje de aparición de la forma clínica de esta patología.

En la práctica es muy común encontrar reticencia por parte de los productores ganaderos a pesar los animales tratando de realizar esta actividad el mínimo número de veces. Esto se debe a que los productores identifican a este manejo como negativo para el desempeño productivo. Se argumenta que los animales para ser pesados deben ser sacados de los corrales y llevados a las mangas, este manejo implica que durante un período de tiempo los animales no coman y se generan horas de ayuno. Cuando los animales son expuestos a una restricción en el tiempo de acceso a la comida, o cuando son sometidos a baja frecuencia diaria de alimentación, existen períodos de ayuno de intensidad variable (Nagaraja y Lechtenberg, 2007). Este ayuno provoca que una vez de regreso al encierro, los animales enfrenten el comedero con mayor voracidad (Forbes y Mayes, 2002), lo que deriva en trastornos que repercuten finalmente en las ganancias de peso diarias. Los manejos que hacen que los animales coman de forma irregular pueden asociarse con una mayor incidencia de SARA (Krause y Oetzel, 2006).

En sistemas de producción intensiva de carne son frecuentes situaciones que impiden el acceso de los animales a la comida. Imprevistos mecánicos en los equipos de alimentación, presencia de clima adverso, dificultades en el desplazamiento de los animales a causa de la formación de barro, movimiento del ganado para trabajos en las mangas, presencia de animales dominantes y mártires facilitado por la jerarquía social que se establece en lotes heterogéneos dentro de un mismo corral, cada uno de estos puntos son factores que puede provocar horas de ayuno. El ayuno se ha identificado como desencadenante de la acidosis ruminal ya que la alimentación con dietas altas en grano después de un período de privación de alimento puede actuar como disparador de la enfermedad (Krause y Oetzel, 2006).

El experimento fue diseñado para estudiar tres intensidades de restricción absoluta de alimento en bovinos en etapas finales de engorde, bajo la hipótesis de que el ayuno puede determinar adaptaciones comportamentales durante la fase de realimentación que actuarán como desencadenantes de episodios de SARA. Esto permitirá una aproximación al conocimiento de hasta qué intensidad de ayuno los animales pueden reponerse sin consecuencias negativas aparentes, y la severidad de ayuno que podría accionar como desencadenante de SARA afectando el comportamiento animal y la eficiencia metabólico-digestivo. Se busca evaluar el impacto que tiene el ayuno, que es comúnmente provocado en la práctica por problemas involuntarios de manejo, en la aparición de acidosis ruminal subaguda en bovinos en sistemas de engorde de terminación.

## 4. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

### 4.1 PÉRDIDAS EN ENCIERROS DE ENGORDE

En EE.UU la morbilidad en los encierros comerciales asciende a 5% - 11% sobre los animales que ingresan al establecimiento (Smith, 1996). El 70%-80% de los problemas sanitarios se deben a patologías respiratorias, 3% a 7% son por desórdenes digestivos y 14% a 28% se atribuyen a causas variadas (Smith, 1996). Las patologías respiratorias constituyen el trastorno más perjudicial dentro de la industria de producción de carne (Edwards, 2010; Hilton 2014; Holman et al. 2015). Los trastornos respiratorios pueden causar reducciones de ganancias de peso diarias de entre 60 a 330 g/animal/d en terneros que posteriormente no logran una ganancia compensatoria (Smith, 1996). Sin embargo, las pérdidas no son sólo de rendimiento productivo, sino que la calidad de la canal también se ve afectada (Engler et al. 2014).

El promedio mensual de mortalidad en los encierros es de 0,27% (0,18% a 0,43%) (Vogel y Parrot, 1994; Smith, 1998). La mayor parte de las pérdidas se deben a enfermedades respiratorias 44%-67%, 26% a desórdenes digestivos y 29% a causas diversas (Smith, 1998; Gagea et al. 2006). La principal causa de muerte se va modificando a medida que transcurre el encierro. La mayoría de las muertes por trastornos de tipo respiratorios ocurren en los primeros 45 días, mientras que los de origen digestivo y otras, se manifiestan de forma más tardía (Edwards, 1996), esto está en concordancia con lo reportado por Smith (1998) que comprobó que las causas de muerte van cambiando a medida que los días de alimentación aumentan. Si bien la morbilidad es más alta en los primeros 45 días de iniciado el engorde, la mortalidad presenta niveles similares a lo largo de todo el tiempo del encierro (<45 días, de 45 a 90 días y > 45 días) (Edwards, 1996). Las pérdidas económicas atribuidas a la morbilidad y mortalidad por enfermedades respiratorias en ganado de carne son aproximadamente de \$2 billones anuales (Fulton, 2009).

En Argentina la mortalidad durante el período de engorde fluctúa entre el 1,0% y el 2,0%, jugando un rol preponderante las enfermedades respiratorias ya que son responsables de más de la mitad de las muertes (Giraudó et al. 2008). Estos sistemas de engorde a corral empiezan habitualmente con el ingreso de terneros destetados desde sistemas pastoriles con un peso inicial de 150 kg a 180 kg hasta lograr el peso de faena que exige el mercado, terneros de 220 kg a 240 kg y novillos livianos de 330 kg a 370 kg, con ganancias de 1,0 a 1,2 kg/día. En estos sistemas de encierro, los trastornos respiratorios y digestivos son las causas más frecuentes de patologías,

concentrándose las pérdidas por morbilidad y mortalidad en los primeros 30 días de ingresados al encierro (INTA, 2001; Giraudo et al. 2008).

Durante los últimos años, en el Uruguay la modalidad de producción de engorde a corral ha experimentado un marcado crecimiento, fomentado prioritariamente por la apertura de nuevos mercados que exigen carne de calidad superior como la cuota 481 de la Unión Europea. Las nuevas exigencias en cuanto a grado de terminación de los animales, ha fomentado sistemas de producción intensiva con condiciones propicias para que tengan lugar una serie de enfermedades subclínicas con impacto negativo sobre el bienestar animal y en términos económicos.

En Uruguay, un cuarto de los establecimientos de engorde comercial, identificaron a la acidosis ruminal aguda como un problema (Banchero et al. 2016). Este dato no está en concordancia con lo reportado en encierros de los EE.UU, lugar dónde, como fue mencionado, la morbilidad más importante está dada por las enfermedades respiratorias (67-82%) (Edwards, 1996; Hilton 2014; Holman et al. 2015), mientras que la incidencia de estas patologías a nivel local representa sólo el 10%. En Uruguay el 34,3% de los casos clínicos reportados se debe a desórdenes digestivos representando en EE.UU sólo el 3 - 7% de la casuística.

La mortalidad promedio registrada en encierros en Uruguay es de 0,43% con un rango que oscila entre 0,02% y 1,0%. En los sistemas de engorde a corral uruguayos la mayoría de los problemas sanitarios son derivados de la alimentación empleada en estos tipos de establecimientos donde la principal causa de muerte es la acidosis ruminal (45,0%) (Banchero et al. 2016). El siguiente 34,0% se atribuye a las enfermedades clostridiales y muertes traumáticas o mecánicas. En los encierros uruguayos el 61,0% de las patologías se producen en los primeros 30 días del encierro (Banchero et al. 2016), lo que concuerda con la bibliografía internacional (Smith, 1998; Costa et al. 2003).

Uruguay presenta singularidades en sus sistemas de encierro que podrían explicar esta incidencia diferente de patologías tanto a nivel de morbilidad como de mortalidad. Por un lado, el confinamiento se da mayormente en categorías adultas ya que como insumo de engorde se usan animales de más de un año de edad con más de 350 kg de peso vivo (DIEA, 2015). Otro punto importante es que los animales que se engordan, generalmente, provienen de establecimientos donde han tenido acceso a una alimentación basada casi exclusivamente a forraje. Si bien es probable que parte de los animales hayan consumido en algún momento de su vida granos u otros suplementos, el nivel de suplementación cambia de manera significativa desde la etapa pastoril a la etapa de encierro. Estos aspectos acompañados de posibles errores de manejo pueden accionar como desencadenante de las indigestiones.

Estas características particulares que tiene Uruguay incentivan el desarrollo de investigación a nivel local con el fin de obtener información científica que aborde los problemas sanitarios que tienen mayor impacto en nuestras condiciones. En el hemisferio norte se ha estimado que SARA afecta a 20-40% de los animales de alta producción en los rodeos lecheros (Kleen, 2004), teniendo una prevalencia de 11% a 29% en vacas durante la lactación temprana (Tajik y Nazifi, 2011). Se estima que en rodeos lecheros los costos de pérdidas por SARA como resultados de las mermas productivas pueden llegar a 400 US\$ por lactación (Plaizier et al. 2008)

## **4.2 ECOLOGÍA RUMINAL**

Los rumiantes poseen un complejo sistema digestivo con tres cámaras de fermentación, retículo, rumen y omaso, que preceden al abomaso conocido como estómago verdadero por ser la porción glandular. Al igual que todos los mamíferos, estos animales no tienen las enzimas que permiten degradar enlaces glucósidos  $\beta$ -1,4 de la glucosa, por lo tanto, para conseguir el aprovechamiento de estas fuentes de energía se ha producido una adaptación simbiótica con un ecosistema microbiano. El sistema digestivo del hospedero está en relación dinámica con una comunidad microbiana encargada de fermentar y sacar provecho de estos polisacáridos insolubles para la obtención de energía (Tajima et al. 2000; Kamra, 2005). Las diversas relaciones sinérgicas y antagónicas entre microorganismos hacen posible que los rumiantes puedan utilizar eficientemente una amplia variedad de alimentos (Bergen, 2004; Ferrer et al. 2005; Kamra, 2005). Si bien esta gran población microbiana permite que gran cantidad de materia orgánica sea digerida diariamente en el rumen (Jouany y Morgavi, 2007), este ecosistema microbiano es muy sensible a cambios en la dieta (Tajima et al. 2001).

La composición de la microbiota ruminal es el resultado de la combinación de múltiples factores como el tipo de dieta, aditivos, estado fisiológico, edad, condición y especie del huésped, estación y condiciones geográficas (Stewart et al. 1997; Pers-Kamczyc et al. 2011). La comunidad de microorganismos se compone por gran diversidad de bacterias anaerobias ( $10^{10}$  células/ml), protozoos ( $10^5$  a  $10^6$  células/ml), arqueas ( $10^7$  a  $10^9$  células/ml), bacteriófagos ( $10^8$  a  $10^9$  células/ml), y hongos ( $10^3$  a  $10^5$  zoosporas/ml) (Mackie et al. 2002; Kamra, 2005).

Para el mantenimiento, crecimiento y producción, los rumiantes dependen de la energía generada a partir de la alimentación por microorganismos ruminales y de productos que escapan al rumen, que son conocidos como productos de bypass. El

ganado ingiere carbohidratos que son sometidos a fermentación microbiana a nivel ruminal originando productos como ácidos grasos volátiles (AGV) de cadena corta, donde destacan ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico; CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>; y ocasionalmente ácido láctico (Kohn y Boston, 2000). Los AGV son absorbidos de forma rápida a través del rumen y metabolizados en los tejidos. La mayoría de los nutrientes que efectivamente aprovecha el rumiante son producidos en el rumen a partir del metabolismo microbiano de los carbohidratos y proteínas o nitrógeno no proteico (Jouany y Morgavi, 2007).

Los microorganismos ruminales además de cumplir un rol importante en la digestión del alimento, poseen otra gran relevancia ya que su proteína conocida como proteína microbiana es considerada la principal fuente proteica para el rumiante por poseer alto valor biológico y digestibilidad intestinal elevada (Stern et al. 1994; Hoover y Miller, 1996; Dewhurst et al. 2000). Deben existir simultáneamente cantidades adecuadas de sustratos energéticos, y nitrógeno, pero también de minerales y factores de crecimiento para que exista un crecimiento microbiano activo.

El pH ruminal es uno de los parámetros que afectan directamente al crecimiento microbiano y, como consecuencia, modifica la fermentación ruminal. Además, se relaciona con el tipo de microorganismo predominante en el rumen (Pereira et al. 2007). Por ejemplo, un nivel de pH bajo, inferior a 6,0 inhibe el crecimiento de la microbiota celulolíticas y disminuye las tasas de digestión ruminal de celulosa y hemicelulosa (Annison et al. 2002).

#### **4.3 ACIDOSIS LÁCTICA RUMINAL Y ACIDOSIS RUMINAL SUBAGUDA**

La acidosis ruminal es un complejo trastorno nutricional y metabólico frecuente que afecta la producción y el bienestar del ganado en todo el mundo (Oetzel, 2003; Enemark, 2008) con gran importancia en la industria láctea y también en los sistemas de producción de carne donde se asocia con las prácticas de gestión de alimentación. El complejo de acidosis ruminal puede manifestarse en una variedad de formas (Kleen et al. 2003) pero se ha simplificado según el nivel de gravedad en: acidosis láctica ruminal y acidosis ruminal subaguda también conocida como acidosis subclínica o acidosis crónica (Kleen et al. 2003; Enemark, 2008). Si bien la acidosis ruminal subaguda y acidosis ruminal aguda comparten una etiología similar, clínicamente constituyen enfermedades diferentes con distintas manifestaciones.

Estas patologías se desencadenan por la ingestión de carbohidratos de muy fácil fermentación en cantidades superiores a las que normalmente puede tolerar el rumen

con presencia insuficiente de fibra físicamente efectiva (Galyean et al. 2003; Bramley et al. 2008). En sistemas intensivos es frecuente el uso de dietas de terminación con formulaciones densamente energéticas para cubrir los requerimientos nutricionales de rumiantes de alta producción (Oetzel, 2003). A consecuencia de este alto nivel de carbohidratos se genera un rápido aumento en la producción de AGV mientras que el pH ruminal desciende por debajo de los valores ruminales normales de 6,7-6,8 (Stock y Britton, 1993), o 5,8-6,5 para animales ya adaptados al consumo de granos (Nagaraja y Titgemeyer, 2007), como resultado de la acumulación de los ácidos. Estos cambios en el pH ruminal modifican el aprovechamiento de los alimentos por alteraciones microbiológicas y metabólicas.

La severidad de la acidosis ruminal está determinada por la magnitud de la caída del pH y el tiempo durante el cual el pH permanece bajo. Es complejo determinar un punto de corte de pH para diferenciar la ocurrencia de uno u otro tipo de acidosis (Stock y Smith, 2000). En este sentido, existen diferentes criterios de clasificación según los diversos autores, pero en general se ha definido para el diagnóstico de SARA valores de pH ruminal entre 5,5 a 5,8 (Owens et al. 1998; Garrett et al. 1999; Beauchemin et al. 2003; Gozho et al. 2005; Bramley et al. 2008; Beauchemin y Penner, 2009), 5,2 a 5,6 (Keunen et al. 2002) y 5,0 a 5,5 (Nagaraja et al. 1998). Se ha propuesto como diagnóstico de SARA valores de pH menores a 5,6 o 5,5 por períodos de más de tres horas (Gozho et al. 2005; Gozho et al. 2007); y para la identificación de acidosis ruminal aguda valores de pH menores a 5,0 o 5,2 (Garrett et al. 1999; Mutsvangwa et al. 2002; Beauchemin et al. 2003; Nagaraja y Titgemeyer, 2007).

La concentración de los AGV ruminales refleja la tasa de producción y absorción de los mismos. La medición de la concentración de AGV total e individual y las proporciones entre los ácidos es útil como indicador de perturbaciones ruminales como la acidosis, reflejando la respuesta a los sustratos alimenticios y el manejo de la alimentación. Es frecuente que durante cuadros de acidosis la relación entre los diferentes AGV se modifique (Nocek, 1997).

La acidosis ruminal subaguda se caracteriza por caídas del pH ruminal de tipo intermitente que llega a niveles no fisiológicos que perduran durante varias horas al día. Estos descensos sucesivos de pH ruminal producen una alteración temporal de la tasa de fermentación con cambios en la población microbiana. Si bien, el factor que la desencadena no es lo suficientemente prolongado o intenso para desarrollar signos clínicos (Nordlund y Garrett, 1994), la ingestión del alimento y la producción de los animales se ven alteradas (Owens et al. 1998; Krause y Oetzel, 2006; Sauvant et al. 2006). La depresión del pH ruminal es menos pronunciada y se origina, principalmente, por la acumulación ruminal de productos finales de la fermentación

como AGV más que por el acúmulo de ácido láctico (Nagaraja y Titgemeyer, 2007). Este punto es discutido, hay autores que sostienen que durante la acidosis ruminal subaguda no se acumula ácido láctico como sí ocurre durante la acidosis láctica aguda (Khafipour et al. 2009a). Por otro lado, Jouany (2006) sostiene que durante episodios de SARA el ácido láctico puede acumularse y sería controlado por las bacterias utilizadoras del ácido láctico.

La acidosis se define como una disminución de los compuestos básicos en relación a la concentración de ácidos a nivel ruminal y en estados más avanzados en los distintos fluidos corporales (Owens et al. 1998). La perturbación del rumen afecta su funcionamiento, a medida que el pH ruminal disminuye también lo hacen la frecuencia y amplitud de las contracciones ruminales, lo que finalmente deriva en estasis y aumento relativo de la carga ruminal (Huber, 1976; Braun et al, 1992; Oetzel, 2000). La frecuencia de las contracciones ruminales puede disminuir desde 1,6 a 0,8 por minuto a medida que incrementa el concentrado en la dieta (Leedle et al. 1995). También tienen lugar procesos de ruminitis e hiperqueratosis (Nocek, 1997). Los signos clínicos de la acidosis ruminal en la vaca lechera incluyen caída en la producción láctea, heces blandas o diarrea, baja condición corporal, descenso de tenor graso en la leche, claudicaciones, pérdida de apetito y consumo de alimento con patrón cíclico y finalmente la muerte (Enemark, 2008; Plaizier et al. 2008). Se han registrado reducciones de hasta el 50% del CMS en referencia al consumo entre días consecutivos (Blanch et al. 2009).

Los signos clínicos de SARA son leves y varían desde anorexia transitoria, deshidratación, depresión, laminitis, abscesos y disminución en la producción láctea (Duffield et al. 2004). Se afecta al número y la intensidad de los movimientos peristálticos ruminales y como consecuencia la estructura de las heces se modifica existiendo muchas veces diarrea intermitente (Ceroni y Shabani, 2011). La alteración en el rumen se vincula con incrementos de moléculas pro inflamatorias como la histamina (Ahrens et al. 1967), incremento de endotoxinas (Khafipour et al. 2009a) y activación de respuesta inflamatoria (Gozho et al. 2007).

Mientras que SARA puede considerarse como una enfermedad colectiva o de rebaño, la acidosis ruminal aguda constituye una alteración de tipo individual (Nordlund y Garrett, 1994). SARA es difícil de detectar y a menudo se diagnostica erróneamente, atribuyéndole la sintomatología a otras causas, y frente a esta situación, los parámetros paraclínicos podrían ser útiles en el reconocimiento del cuadro en etapas lo suficientemente tempranas que permitan la implementación de medidas correctivas (Enemark, 2008).

El diagnóstico de acidosis ruminal y SARA se logra a través de la evaluación conjunta de signos clínicos, historial de la gestión de la alimentación, medición de parámetros de la fermentación ruminal y la cuantificación del rendimiento productivo. Es de utilidad diagnóstica la evaluación de la combinación de parámetros como el consumo de MS, valores de pH ruminal, concentración de AGV, N-NH<sub>3</sub> y ácido láctico (Bramley et al. 2008).

Los animales que están potencialmente en riesgo de acidosis son aquellos que tienen inadecuada capacidad tamponadora en el rumen ya sea por: recibir dietas con nivel insuficiente de fibra, consumir carbohidratos fácilmente fermentables en exceso, o presentar una microbiota ruminal o papilas ruminales no adaptadas a las dietas mencionadas (Krause y Oetzel, 2006; Nagaraja y Titgemeyer, 2007; Plaizier et al. 2008). Algunas estrategias para mitigar SARA incluyen la utilización de dietas totalmente mezcladas (TMR) en vez del suministro de cada componente del alimento por separado; la administración de comidas de volumen pequeño, con mayor frecuencia y a intervalos regulares; y la introducción progresiva de concentrados para permitir la adaptación de la microbiota ruminal asegurando un contenido mínimo de fibra físicamente efectiva (Krause y Oetzel, 2006). Se estima que cuando el manejo de los comederos es adecuado y se incorporan ionóforos en la formulación, los requerimientos mínimos de fibra neutro detergente efectiva (FNDe) para mantener el pH ruminal encima de 5,6-5,7 deberían ser del 5 a 8% de la MS total. Mientras que, si el manejo del comedero es deficiente y no se incluyen ionóforos a la dieta, estos niveles mínimos deberían ser mayores a 20% de la MS total (NRC, 1996).

#### **4.4 AMBIENTE Y FERMENTACIÓN RUMINAL**

La fermentación ruminal está condicionada tanto por las cualidades químicas de la dieta como por el estado físico de los alimentos. Los alimentos concentrados se componen por carbohidratos de fácil digestión como lo son los azúcares solubles y el almidón, estos carbohidratos sufren un proceso fermentativo más acelerado que los carbohidratos de tipo estructural como la celulosa y la hemicelulosa.

Los productos finales inmediatos de la degradación microbiana son principalmente hexosas y pentosas, que luego se utilizan para el mantenimiento o crecimiento microbiano (Beever, 1993). La fermentación de la hexosa para la generación de ATP para la actividad microbiana genera como productos finales los AGV de cadena corta como acético, propiónico y butírico, CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> y ocasionalmente ácido láctico (Beever, 1993; van Soest, 1994 y France y Dijkstra, 2005). Los AGV derivados de la fermentación anaeróbica son rápidamente absorbidos por la pared ruminal y proveen

del 60 al 70% de la energía para los procesos metabólicos de un bovino adulto (van Soest, 1994; Voelker y Allen, 2003).

El rumen está adaptado para mantener condiciones óptimas para el desarrollo de la microbiota, constituye un compartimento dinámico y heterogéneo con valores de pH que fluctúan a lo largo del día entre 0,5 y 1 unidades (Dado y Allen, 1993; Nocek et al. 2002; Keunen et al. 2002; Kleen, 2004). Cuando el régimen de alimentación es continuo las fluctuaciones del pH ruminal durante el día son poco notorias (Pérez et al. 1997). Estas variaciones se producen en función del tipo de dieta, la frecuencia de alimentación y el nivel de ingesta entre otros factores (Cerrato et al. 2005). El pH ruminal es un parámetro importante que regula los procesos digestivos. El flujo de los alimentos, el agua y el aporte de saliva mantienen el pH ruminal en valores fisiológicamente normales cercanos a la neutralidad y levemente ácidos (Bryant, 1959). Al aumentar la relación entre el almidón y la fibra neutro detergente (FND) puede aumentar la concentración de AGV y modificarse su perfil (Beckman y Weiss, 2005).

Normalmente los AGV más abundantes en el líquido ruminal son acético y propiónico y butírico que en conjunto representan hasta el 90% de todos los AGV (Hungate, 1966). Para el ganado alimentado con dietas forrajeras, la concentración normal de AGV totales es entre 70 a 130 mM, con relación ácido acético:propiónico:butírico de 70:20:10 o 65:25:10 (Church, 1993; France y Dijkstra, 2005). Cuando en la alimentación se incrementa el uso de granos y durante la acidosis ruminal se dan aumentos en las concentraciones de ácido propiónico de aproximadamente 35 a 45 % del total de AGV a expensas de la disminución del ácido acético (France y Dijkstra, 2005; Rabiee y Lean, 2012).

Cuando los productos ácidos de la fermentación exceden esta capacidad tamponadora, se puede producir un gran descenso del pH ruminal, situación que podría derivar en la disminución de la función ruminal con necrosis de las papilas ruminales, comprometiendo así su capacidad de absorción y en consecuencia la productividad animal según la gravedad del caso (Russell y Hespell, 1981). Cada reducción del pH ruminal se acompaña de cambios en el perfil de los AGV, predominando el ácido propiónico en detrimento del acético, mientras que cuando el pH se desploma por debajo de 5,5 el ácido láctico comienza a acumularse (Dirksen, 1969; Britton et al. 1989). La acidificación del medio ruminal puede ser la limitante para la digestión de las paredes celulares de los forrajes. Se ha observado tanto en abordajes *in vitro* como *in situ* que frente a un pH ruminal bajo la actividad celulolítica de la microbiota, así como la digestibilidad de la fibra disminuyen (Mouriño et al. 2001; Tripathi et al. 2004).

Normalmente, los valores mínimos de pH ruminal se registran entre 0,5 y 4 h post ingesta lo que coincide con la mayor producción de AGV (Church, 1993). El pH además de ser un regulador de la producción y crecimiento microbiano (Russell y Dombrowski, 1980), puede afectar la producción de los productos finales de la digestión. Existe una correlación negativa entre pH ruminal y la concentración de AGV sin embargo la relación es débil ( $r^2= 0,13$ ) probablemente a causa de los múltiples factores que contribuyen a determinar el pH ruminal (Allen, 1997).

La medición de la concentración de AGV individuales y totales, así como el análisis de las proporciones entre los mismos, se emplea como indicador de perturbación ruminal. Durante la acidosis se da una producción rápida de AGV en el rumen (Huntington, 1988) que son absorbidos, en su forma no disociada, hacia el torrente sanguíneo con el fin de reducir su concentración y estabilizar el pH (Sniffen y Thomas, 1991; Dijkstra et al. 1993). El pKa para la mayoría de los AGV es de aproximadamente 4,8, por lo tanto, una caída del pH ruminal en torno a esos valores conduce a un incremento de su forma no disociada aumentando sus tasas de absorción (Kohn y Dunlap, 1998). Aunque también, un bajo pH ruminal podría llegar a disminuir la motilidad ruminal, resultando en una menor capacidad ruminal de mezcla de su contenido y, en consecuencia, una tasa de absorción más lenta (Voelker y Allen, 2003; Kristensen y Harmon, 2004). En una inducción de SARA mediante el desafío con pellets de cascarilla de soja y maíz en animales sometidos a ayuno previo de 12 horas, se pudo comprobar que el pH ruminal descendió linealmente con el tiempo pos-alimentación, mientras que la concentración ruminal de AGV totales aumentó de forma lineal luego del suministro de la comida (DeFrain et al. 2002).

En condiciones normales el ácido láctico se encuentra en concentraciones bajas, menores a 5,0 mM (Keunen et al. 2002). Sin embargo, se han descrito episodios de SARA con niveles de ácido láctico entre 0,45 a 10 mM (Keunen et al. 2002; Martin et al. 2006) así como se han reportado casos de animales con niveles mayores a 5,0 mM sin signos clínicos de acidosis (Golder et al. 2012). Pero definitivamente concentraciones de ácido láctico superiores a 40 mM se consideran indicativos de acidosis aguda grave (Owens et al. 1998). Se ha observado también que la concentración de ácido láctico está condicionada por el tipo de carbohidratos suministrados (Harmon et al. 1985; Heldt et al. 1999; Golder et al. 2012).

El ácido láctico en el rumen puede seguir diferentes vías como, por ejemplo: acumularse, ser absorbido hacia el torrente sanguíneo, continuar su pasaje hacia el tracto posterior del aparato digestivo, o ser fermentado a AGV (Huntington, 1988; Stewart et al. 1997). El pKa de éste ácido, 3,9, es menor al de los AGV, por lo que su absorción es más lenta y tiende a acumularse favoreciendo caídas más pronunciadas en el pH ruminal (Slyter, 1976; Russell y Hino, 1985; Oetzel, 2003). Frente a

reiterados desafíos de SARA el nivel de ácido láctico ruminal tiende a crecer proporcionalmente (DeFrain et al. 2002).

El nitrógeno amoniacal ( $N-NH_3$ ) ruminal surge como producto final de la degradación de proteína de la dieta que se degrada en el rumen, a partir del catabolismo microbiano de aminoácidos, péptidos y sustancias nitrogenadas no proteicas como la urea (Russell y Hespell, 1981). Estos orígenes constituyen la más importante fuente de nitrógeno para las bacterias ruminales (Allison, 1969; Russell y Strobel, 1987). Aproximadamente el 60% de la proteína verdadera se degrada a amoníaco y el resto se escapa del rumen (Satter y Roffler, 1975). La tasa de utilización de amoníaco depende del número de bacterias, de su tasa de crecimiento y de la disponibilidad de energía obtenida a partir de carbohidratos (Satter y Roffler, 1975). El amoníaco difunde pasivamente a través de las membranas celulares bacterianas y se emplea para su crecimiento junto con péptidos y aminoácidos. Sin embargo, se ha comprobado que algunas bacterias pueden usar transporte activo de amoníaco (Russell y Strobel, 1987). Cuando la cantidad de carbohidratos es restrictiva, la degradación de proteínas termina con la producción de AGV y amoníaco y, como consecuencia, se limita la disponibilidad de nitrógeno microbiano para el huésped (Russell y Allen, 1983). La medición de la concentración de amoníaco ruminal puede ser un indicador de la función ruminal y de la actividad bacteriana.

La mayoría de las bacterias ruminales pueden utilizar  $N-NH_3$  como fuente de nitrógeno para su crecimiento (Russell, 1996). De esta manera los microorganismos fibrolíticos, a diferencia de la flora amilolítica, son capaces de cubrir sus requerimientos de N para la síntesis proteica solamente con la utilización de  $N-NH_3$  (Bryant, 1973). Por otra parte, la concentración de  $N-NH_3$  ruminal puede variar ampliamente dependiendo de la dieta, tiempo de suministro y frecuencia de alimentación, pero generalmente se produce dentro de un rango de 5-20 mg/dL (Satter y Slyter, 1974; Russell y Strobel, 1987; Pereira et al. 2007). En bovinos, se han registrado concentraciones elevadas de  $N-NH_3$  que oscilan entre 15 y 30 mg/dL (Cajarville et al. 2006a; Aguerre et al. 2009; Aguerre et al. 2013b). A medida que el amoníaco se acumula en el rumen, la eficiencia de la producción microbiana disminuye (Russell y Strobel, 1987).

Se ha propuesto como herramienta útil la medición de la concentración de  $N-NH_3$  para evaluar la función del rumen, así como la actividad bacteriana. Algunos estudios han asociado la acidosis ruminal con bajas concentraciones de  $N-NH_3$  (Bramley et al. 2008) pero de manera contraria, resultados encontrados en cuadros de acidosis clínica mostraron concentraciones elevadas de  $N-NH_3$  (Golder et al. 2014). Frente a

estos resultados se justifican mayores esfuerzos para evaluar la utilidad de la medición del N-NH<sub>3</sub> como indicador de la acidosis ruminal.

#### 4.4.1 ACOSTUMBRAMIENTO A LA DIETA

Uno de los momentos donde los animales están más predispuestos a contraer acidosis es durante la etapa de acostumbamiento a la dieta. Esta fase debe realizarse a lo largo de un periodo prudencial con el objetivo de minimizar los potenciales riesgos. Los niveles de concentrados deberían aumentarse progresivamente a intervalos de 5 a 7 días (Nordlund, 2003). Algunos autores sugieren un período de alrededor de 10 a 21 días para adaptar las poblaciones microbianas a una nueva dieta (Mackie y Gilchrist, 1979) y 4 a 6 semanas para el adecuado desarrollo de las papilas de la mucosa ruminal frente a una dieta rica en concentrado (Dirksen et al. 1985; Nordlund et al. 1995; Nocek, 1997; Nordlund, 2003). Si el tiempo de adaptación es insuficiente, las papilas no se desarrollarán de forma óptima para poder absorber un flujo mayor de AGV producidos y entonces ocasionará que el pH ruminal descienda.

Con respecto a la digestibilidad ruminal y en condiciones *in vitro* se ha visto que cuando el pH ruminal desciende por debajo de 6,2 o 6,0 se reduce la actividad celulolítica de la microbiota lo que repercute en la digestibilidad de la fibra llegando a niveles subóptimos de digestión (Stewart, 1977; Grant y Mertens, 1992; Grant, 1994; Calsamiglia et al. 1999; Leddin et al. 2010).

#### 4.5 RUMIA Y ROL DE LA SALIVA

La regulación de pH ruminal resulta de la combinación de buffers endógenos, como la saliva (van Soest, 1982) y componentes buffer de la dieta (Krause y Oetzel, 2006). La actividad de rumia se estimula en gran medida por la forma física de los alimentos. Los forrajes fibrosos favorecen la rumia, mientras que los alimentos concentrados no la estimulan. La acción de rumiar determina que un gran volumen de saliva llegue al rumen mediante la deglución. La proporción de fibra presente en los alimentos debería contar con un tamaño de partícula que promueva la masticación y el flujo de saliva, favoreciendo el mezclado y haciendo una dilución de los ácidos en el rumen. La capacidad del forraje fibroso para estimular la masticación y el flujo de saliva ayuda a moderar el pH ruminal, la capacidad inherente a la fibra es un factor importante, pero su contribución es menor al rol buffer que realiza la saliva per se (Allen, 1997). Las dietas pobres en fibra se consumen más rápidamente que aquellas más ricas en la misma (DeVries et al. 2007), además, la actividad de

rumia es comparativamente menor en las dietas más pobres en fibra (Maekawa et al. 2002; Beauchemin et al. 2008).

Se ha estimado que la saliva logra neutralizar potencialmente entre el 30 y el 50% del total de los AGV producidos en el rumen (Kay, 1966; Allen, 1997). La secreción de saliva es estimulada por la fibra físicamente efectiva por lo tanto el flujo de saliva varía con la masticación, prueba de esto es que la tasa de flujo de saliva aumenta 1,8 veces en la rumia en comparación con el reposo (Cassida y Stokes, 1986). Claramente, el pH ruminal es afectado por la cantidad de tiempo destinado a la rumia (Owens et al. 1998).

La saliva por su contenido de iones bicarbonato y fosfato de hidrógeno posee pH alcalino alrededor de 8,2 a 8,4, que le confiere un rol neutralizador de ácidos por su capacidad de eliminar hidrogeniones (Owens et al. 1997). Su composición no varía con el tipo de alimento ingerido (Erdman, 1988) por lo tanto su efecto depende de su nivel de secreción. Las dietas muy concentradas energéticamente y con tamaño de partícula pequeño, determinan caídas del pH ruminal a través de dos vías. Por un lado, con una mayor producción de ácidos orgánicos, y por otro, por el menor número de masticaciones y en consecuencia baja secreción de saliva y menor efecto buffer (Krause y Oetzel, 2006).

El rumen es capaz de amortiguar cambios de pH a través de métodos de remoción de hidrogeniones con el objetivo de mitigar el riesgo de acidosis ruminal. Las vías de remoción de hidrogeniones son dinámicas y están influenciadas por la cantidad de ácidos producidos (Allen, 1997). La mayoría de los iones hidrógeno no se eliminan por absorción de los AGV, sino que su eliminación se realiza a través de la neutralización por la saliva. Sin embargo, existe un desfase en este proceso ya que la tasa de producción de ácido en el rumen es más del doble que la tasa de secreción de saliva (Allen, 1997). El ion bicarbonato y el ion fosfato de hidrógeno de la saliva captan los hidrogeniones por diferentes mecanismos. El ion bicarbonato se une con un ion hidrógeno creando ácido carbónico que pasa a formar agua y dióxido de carbono que se expulsa a través de la eructación (Allen, 1997). El fosfato de hidrógeno se combina con un ion de hidrógeno para formar fosfato de dihidrógeno que fluye fuera del rumen a través del orificio omasal (Allen, 1997). A nivel experimental se ha propuesto que el comportamiento de rumia, leído como porcentaje de vacas rumiando dentro de un lote en un momento dado, puede ser utilizado como un indicador de la salud ruminal (Krause y Oetzel, 2006).

#### **4.6 AYUNO EN SISTEMAS DE ENGORDE**

Contrariamente a lo que se podría pensar, en los sistemas de producción intensiva de carne existen situaciones que modifican el patrón de consumo de los animales y provocan ayuno involuntario. Estas limitaciones en el acceso al alimento se vinculan con una mayor incidencia de enfermedades metabólicas. Cada restricción puede ocasionar que, durante la realimentación, ocurra un aumento en el ritmo de ingesta desencadenando episodios de SARA.

El tiempo de acceso al alimento es un punto muy importante que debe ser tenido en cuenta. Cuando se manejan bajas frecuencias diarias de alimentación o cuando los animales son sometidos a una restricción en el tiempo de acceso a la comida, se producen períodos de ayuno que puede ser de mayor o menor duración (Nagaraja y Lechtenberg, 2007). Frecuentemente, cuando finalizan estos períodos de ayuno los animales ingieren el alimento ofrecido con una mayor voracidad o a un ritmo de ingestión más acelerado (Forbes y Mayes, 2002). En trabajos con bovinos para carne a pastoreo se ha comprobado que los animales compensan la restricción al consumo mediante un aumento de su tasa de ingestión en el mismo rango en el que se produjo la disminución del tiempo de pastoreo (Gekara et al. 2005).

Después de cada ingesta y de manera normal, la fermentación ruminal produce grandes cantidades de AGV que generan la disminución del pH que puede persistir por algunas horas. Posteriormente, el pH ruminal vuelve a aumentar logrando su estabilización, debido a la rápida remoción de los AGV por la capacidad de absorción del rumen (Krause y Oetzel, 2006) o por el aporte de sustancias buffer procedentes principalmente de la saliva generada en la rumia del material ingerido (Palmonari et al. 2010).

El consumo en exceso de carbohidratos fácilmente fermentescibles luego de períodos de ayuno se vincula con la aparición de acidosis ruminal subaguda. Se ha evidenciado que la variación en la ingesta diaria disminuye el desempeño productivo de los animales de corral (Galyean et al. 1992; Duffield et al. 2004) y se ha propuesto como un factor que predispone a desórdenes metabólicos como la acidosis (Britton y Stock, 1987; Bauer et al. 1995).

En estudios con ovinos restringidos con acceso a pastura durante sólo 4 h por día, se registró una disminución del pH ruminal posterior a la alimentación que persistió durante varias horas lo que puso en evidencia que la neutralización de los ácidos producidos fue inadecuada (Cajarville et al. 2006; Pérez-Ruchel, 2006). Una mayor frecuencia de alimentación promovería estabilidad del ambiente ruminal con variaciones del pH menos pronunciadas y mayor eficiencia de la fermentación

disminuyendo así el riesgo de acidosis (Kaufmann, 1976; French y Kennelly, 1990; Castro et al. 2002; Freer et al. 2007).

#### 4.7 MICROBIOTA RUMINAL

Las bacterias celulolíticas son especialmente sensibles a los cambios de pH ruminal (Chiquette, 2009), el número de estas bacterias decrece cuando el pH es menor a 6,2 llegando a niveles subóptimos para la digestión de los alimentos (Calsamiglia et al. 1999; Leddin et al. 2010). Cuando el pH es inferior a 6,0 el proceso de fibrólisis realizado por bacterias del rumen se ve inhibido (Russell y Wilson, 1996). Al descender el pH ruminal se favorece el crecimiento de microorganismos productores de ácido láctico como *Streptococcus bovis* (Russell y Hino, 1985) considerado el productor de ácido láctico más importante del rumen (Hungate, 1966; Russell y Dombrowski, 1980; Marounek y Bartos, 1987; Nocek, 1997).

Bajo condiciones normales el ácido láctico es metabolizado por microorganismos que lo consumen. *Selenomonas ruminantium subsp. lactilytica*, *Veillonella parvula*, *Megasphaera elsdenii* y *Anaerovibrio lipolytica* son los microorganismos utilizadores de ácido láctico más relevantes (Lean et al. 2007). *Megasphaera elsdenii* es un coco Gram negativo que utiliza el 60% a 80% del ácido láctico disponible en el rumen (Counotte et al. 1981). Es resistente a ambientes ácidos y su actividad se estimula en presencia de carbohidratos solubles, siendo una de las bacterias más relevantes en el control del metabolismo del ácido láctico (Counotte et al. 1981, 1983). En general, la tasa de crecimiento de las bacterias que consumen el ácido láctico es menor que la de aquellas que lo producen resultando entonces en su acumulación (Oetzel, 2003). Los microorganismos ruminales que fermentan la glucosa a ácido láctico tienden a ser tolerantes a pH ácido, al tiempo que los utilizadores son sensibles a pH bajo (Owens et al. 1998). Cuando el pH ruminal es menor a 5,6 la relación entre los microorganismos productores y utilizadores de ácido láctico aumenta y el ácido láctico se empieza a acumular indicando el inicio de SARA (Nocek, 1997; Goad et al. 1998; Plaizier et al. 2008; Hook, et al. 2011).

Cuando el pH ruminal es menor a 4,7 el crecimiento de *S. bovis* se inhibe y el de *Lactobacillus* spp. se incrementa determinando mayor producción de ácido láctico. El efecto de la retroalimentación positiva resulta en estasis de la fermentación ruminal y absorción de los isómeros D- lactato y L-lactato lo que puede derivar en acidosis metabólica (Bramley et al. 2008).

#### 4.8 RESPUESTA INFLAMATORIA

Las células del epitelio ruminal no están cubiertas por mucus lo que provoca que la mucosa del rumen sea vulnerable al daño químico inducido por la acidez del medio. El ambiente ácido del rumen, los cambios en la presión osmótica, y los lipopolisacáridos ruminales, hacen que el epitelio del rumen se vuelva susceptible a alteraciones como procesos de inflamación, erosión y ulceración. Durante la multiplicación y la lisis bacteriana son liberados lipopolisacáridos (LPS) que son las endotoxinas de las paredes celulares de bacterias Gram negativas (Rietschel et al. 1994). Durante los episodios de SARA tiene lugar un incremento de la destrucción bacteriana lo que aumenta la concentración de LPS ruminales (Gozho et al. 2005). El pH ruminal subóptimo tiene efectos negativos sobre la salud y el bienestar de los animales, donde se incluyen cambios en el balance de la microbiota ruminal y aumento en la permeabilidad del epitelio y ruminitis (Owens et al. 1998). La ruminitis es la lesión fundamental de SARA y es el origen de los problemas crónicos desarrollados varias semanas o meses después de ocurrido el episodio de acidosis (Oetzel, 2003). La patogénesis de la ruminitis aún no se ha comprendido completamente, pero se estima que el incremento de los AGV, así como la elevación temporal del ácido láctico ruminal o las fluctuaciones en la osmolaridad del fluido ruminal, pueden estar involucradas en el desarrollo de esta condición (Dirksen et al. 1985; Krehbiel et al. 1995; Enemark, 2008). La etapa de paraqueratosis que está caracterizada por el engrosamiento del estrato córneo de la mucosa del rumen y la etapa de ruminitis, no son muy definidas (Dirksen et al. 1985). La paraqueratosis que es consecuencia del aumento de la producción de ácido láctico en los casos de acidosis clínica, puede a largo plazo, afectar la absorción de AGV (Krehbiel et al. 1995).

Cuando el rumen sufre inflamación en la mucosa tienen lugar alteraciones que facilitan la colonización bacteriana y la traslocación al torrente sanguíneo de toxinas y sustancias vasoactivas. Por la vía vena porta estas sustancias llegan al hígado donde se producen abscesos hepáticos y otros efectos deletéreos a distancia como la laminitis (Nocek, 1997; Kleen et al. 2003; Gozho et al. 2005). Normalmente, el rumen tiene un bajo nivel de permeabilidad a las endotoxinas (Andersen et al. 1990), pero las lesiones en el epitelio del rumen asociadas a SARA pueden resultar en la translocación de LPS ruminales al torrente sanguíneo. La traslocación activa una respuesta inflamatoria sistémica conocida como respuesta de fase aguda (Werling et al. 1996; Owens et al. 1998; Gozho et al. 2005; Gozho et al. 2007; Khafipour et al. 2009a) acompañada del incremento en la concentración sérica de proteínas de fase aguda (PPA, Ametaj et al. 2009) como haptoglobina (Hp) y de amiloide sérico A (SAA, Gozho et al. 2007; Zebeli et al. 2012). La Hp es la PPA de mayor importancia

en el ganado (Horadagoda et al. 1999), en animales sanos es indetectable (Eckersall y Conner, 1988), pero, dentro de las primeras 24 a 48 h luego de un daño tisular, el nivel de Hp aumenta entre 50 y 100 veces en relación a su nivel basal lo que le confiere gran utilidad práctica y temprana al momento de detectar estados patológicos subclínicos (Godson et al. 1996; Cole et al. 1997). Se postula a la Hp como proteína de utilidad como marcador inflamatorio asociado con salud ruminal, ya que sus niveles pueden elevarse como resultado de la inflamación de la pared ruminal inducida por la acidosis sin la presencia de otros signos clínicos (Trevisi et al. 2010). Si bien los valores de pH ruminal bajos son el paso inicial en la patogénesis de SARA, las proteínas de fase aguda y específicamente la cuantificación de Hp podría ser empleada como biomarcador de la inflamación causada por esta patología (Gozho et al. 2007; Khafipour et al. 2009a).

Experimentalmente, novillos sometidos a inducción de acidosis subaguda, con valores de pH ruminal inferiores a 5,6 por más de 3 h por día, presentaron niveles de Hp elevada en suero en comparación con aquellos animales no afectados (Gozho et al. 2005). En vaquillonas raza Danish Holstein con acidosis ruminal y sistémica inducida mediante sobrecarga oral de oligofructosa (17 g/kg PV) se vio una respuesta diferencial de las proteínas de fase aguda (Danscher et al. 2009), al igual que en hembras lecheras con la forma subclínica de acidosis (Plaizier et al. 2008). Se estima que el incremento de los niveles en suero de proteínas de fase aguda durante la acidosis posiblemente sea resultado de la ruminitis que facilita la translocación de moléculas pro-inflamatorias a través del epitelio ruminal dañado causando efectos sistémicos (Danscher et al. 2009). Se han reportado casos de SARA con niveles de SAA entre 160 y 500 mg/L y de Hp entre 250 y 1900 mg/L (Gozho et al. 2005; Gozho et al. 2006; Khafipour et al. 2006; Gozho et al. 2007). La Hp podría ser un marcador de presencia de destrucción tisular acompañado de procesos de inflamación, lo que permite un monitoreo *in vivo* de la enfermedad sin necesidad de procedimientos invasivos (Danscher et al. 2009).

#### 4.8.1 FUNCIONAL HEPÁTICO

Existen indicadores sanguíneos que permiten una evaluación de la funcionalidad hepática. Algunas de las pruebas convencionales que brindan información sobre la integridad de los hepatocitos son la cuantificación de alanina transaminasa (ALT) y transaminasa glutámico-oxalacética o aspartato aminotransferasa (GOT-AST), mientras que el nivel de fosfatasa alcalina (ALP) y gamma glutamil transpeptidasa (GGT) permiten dar una aproximación sobre la integridad del sistema biliar. La capacidad excretora del hígado puede ser evaluada mediante la cuantificación de

bilirrubina total y la función de síntesis hepática es estudiada a través de la valoración del nivel de albúmina (Tennant et al. 2008).

A nivel sérico los dos componentes principales de proteína son la albúmina y las globulinas. La albúmina es la proteína más abundante de las proteínas plasmáticas representando el 35 a 50 % de las proteínas séricas totales, su síntesis ocurre exclusivamente en el hígado y es la principal responsable de la presión osmótica plasmática. El rango normal de albúmina (g/dL) en bovinos es de 3,20 - 4,32 g/dL (Tennant et al. 2008). La concentración de albúmina se determina por la tasa de síntesis hepática, que normalmente está en equilibrio con la degradación. Es considerada una proteína de fase aguda negativa frente a procesos inflamatorios y cumple un rol importante en la formación de los polímeros de haptoglobina plasmática (Eckersall et al. 1990). La fracción de globulinas se compone de varias proteínas, pero principalmente consiste en inmunoglobulinas que se sintetizan en células linfoides y de otras globulinas que son producidas en el hígado (Russell y Roussel, 2007). Los perfiles bioquímicos usualmente incluyen la cuantificación de albúmina y la concentración de las proteínas séricas totales, mientras que la fracción de globulinas es calculada como la diferencia entre la concentración de proteínas totales y la cantidad de albúmina (Russell y Roussel, 2007).

Las fosfatasas alcalinas (ALP) comprenden un grupo heterogéneo de enzimas asociadas a membranas celulares. Si bien su función fisiológica exacta es desconocida, su actividad es un indicador bioquímico útil de enfermedad hepática particularmente de enfermedad colestásica (Coppo, 2015). Algunos estudios han demostrado que la actividad de la ALP es más alta en las superficies de absorción o de secreción de las células (Kaplan, 1972). Dentro de los hepatocitos, la ALP se encuentra en concentraciones elevadas en los márgenes celulares que limitan los conductos biliares, cuando existe daño hepático las células lesionadas liberan cantidades importantes de esta proteína hacia la sangre. Por tanto, es posible que ante una obstrucción que involucre uno o varios conductos como ocurre en casos de tumores o abscesos hepáticos, la concentración de ALP se elevará sobrepasando el rango fisiológico normal que en bovinos es de entre 142 a 212 U/L.

La enzima GOT-AST está ampliamente distribuida encontrándose en numerosos tejidos y órganos con gran actividad como el hígado (Zimmerman et al. 1968). Frente a una lesión hepatocelular aguda o crónica o necrosis hepática, su nivel en sangre se incrementa significativamente (Russell y Roussel, 2007). La concentración de GOT-AST se eleva frente a causas de daño parenquimatoso en hígado como por ejemplo en las distomatosis y en presencia de daño muscular debido al decúbito extremo (Brown et al. 1999; Rubel et al. 2005; Almeida et al, 2008). El aumento de actividad de la AST en el suero es considerado como un marcador sensible de daño hepático,

incluso si el daño es de naturaleza subclínica (Kauppinen, 1984; Meyer y Harvey, 1998). En estudios anteriores se han verificado aumentos marcados de GOT-AST a partir de las 24 h de realizada la inducción experimental de acidosis (Braun et al. 1992; Patra et al. 1996). En casos de necrosis hepática la actividad enzimática de la AST se eleva, mientras que incrementos séricos de ALP y GGT sugieren colestasis intra o extrahepática (Kaneko, 2008). A diferencia de lo que ocurre en otras especies, las células del hígado en rumiantes no muestran elevada actividad de Alanina transaminasa (ALT) y el aumento de la actividad de esa enzima en el suero durante el daño al hígado, incluso en cuadros de necrosis hepática, es insignificante (Forenbacher, 1993).

La GGT es una enzima unida a membrana que se encuentra en muchos tejidos, pero principalmente en las células con altas tasas de secreción o absorción. Los incrementos notables en la actividad sérica de GGT se observan en enfermedades del hígado, siendo considerada un marcador sérico de las enfermedades del sistema hepatobiliar asociadas a colestasis (Grunder, 1977; Braun et al. 1983; Allison, 2012). A diferencia de la ALP, la GGT no se incrementa significativamente en situaciones de necrosis hepática (Meyer, 1983). Sin embargo, sí se puede dar un aumento marcado de GGT frente a enfermedad hepatocelular donde se da colestasis de forma secundaria (Braun et al. 1983). Si bien la actividad de GGT generalmente se correlaciona con el nivel sérico de ALP en caso de injuria hepática colestásica (Kaneko et al. 2008), se considera que el aumento de su actividad tiene mayor sensibilidad diagnóstica que la ALP (Fernández et al. 2007).

La respuesta inflamatoria a una lesión tisular es un mecanismo fundamental por el cual el huésped activa sus defensas para iniciar una serie de eventos químicos relacionados con el proceso de reparación. Este proceso está mediado por la liberación de citoquinas de los leucocitos que se reúnen en el lugar de la lesión. Las citoquinas son polipéptidos que se liberan a la circulación para llegar al hígado donde inducen la síntesis y liberación de las proteínas de fase aguda (Kaneko et al. 2008). La citoquina proinflamatoria IL-1 inhibe el activador nuclear implicado en la expresión de los genes que codifican las enzimas clave en el *clearance* de la bilirrubina (Assenat et al. 2004). En esta situación la eliminación de bilirrubina se reduce y como consecuencia se producen aumento de bilirubinemia. Asimismo, cuadros de obstrucción biliar intra o extra hepática puede derivar en incremento del nivel de bilirrubina (Russell y Roussel, 2007).

El estudio de todos estos indicadores sanguíneos y sus patrones permitirá una aproximación al funcionamiento hepático y la detección de daño hepático aparente.

#### **4.9 MODELOS DE INDUCCIÓN EXPERIMENTAL DE ACIDOSIS**

La mayor parte de la información sobre acidosis clínica y SARA disponible proviene de dos tipos de modelos experimentales utilizando bovinos, ovinos o cabras. El primer tipo está relacionado con el tipo de concentrado energético, su procesamiento, la forma de administrarlo y el nivel de fibra (Mertens, 1997; Goad et al. 1998; Coe et al. 1999; Brown et al. 2000; Kleen et al. 2009). El segundo tipo de modelos se basa en la aplicación de restricciones al consumo provocando variaciones en la ingesta diaria (Galyean et al. 1992).

**Cuadro I.** Resumen de modelos de inducción experimental de acidosis empleados hasta el momento.

<b>Animal</b>	<b>Dieta adaptación</b>	<b>Restricción (horas o cantidad)</b>	<b>Desafío</b>	<b>Vía adm</b>	<b>Referencia</b>
Vacas Jersey secas	heno		70 g/kg PV de grano	oral	Andersen y Jarlov 1990
Terneras	base forrajera 100% festuca <i>ad libitum</i>		concentrado, incrementos de 2,5 Kg por día hasta llegar a 12,5 Kg	oral	Blanch et al. 2009
Novillos para carne	dieta con suplementación al 1,7% de PV con 50% de concentrado	ayuno de 24 horas	100% concentrado (trigo:maíz) a una dosis de 1,5% PV	oral	Brown et al. 2000
Vaquillonas Danish Holstein			oligofructosa (17 g/kg PV)	oral	Danscher et al. 2009
Vacas Holstein múltiparas		ayuno de 12 horas	pellets de cascarilla de soja y maíz	oral	DeFrain et al 2002
Vacas Holstein mitad lactación	adaptación durante dos semanas a ración TMR	restricción de alimentación del 50% CMS <sup>3</sup> durante 1 día	4 kg de cebada y trigo (en relación 1:1) posteriormente suministro de TMR <sup>2</sup> <i>ad libitum</i>	oral	DeVrides et al. 2008
Carneros	heno <i>ad libitum</i>	ayuno de 24 horas	0,5 kg de harina de trigo y solución de lactulosa (30 g de lactulosa en 200 ml de agua)	oral	Minuti et al. 2014
Vaquillonas Cruza	incremento de concentrado en dieta desde 40% a 90%		adaptación rápida (65% de concentrado por 3 d) o gradual (5 dietas intermedias 48,3 / 56,7 / 65,0 / 73,3 / 81,7% por 3 d c/u)	oral	Bevans et al. 2005
Novillos para carne	dieta de alfalfa 80%:20% grano		dos dosis de 1,25 % del PV con una mezcla de maíz molido y almidón de maíz	oral	Nagaraja et al 1985
Novillos para carne	dieta de alfalfa 80%:20% grano		dos dosis de 1,25 % del PV con una mezcla de maíz molido y almidón de maíz	oral	Coe et al. 1999

Novillos para carne	adaptado a 70% de concentrado		maíz al 1,3 % del PV	oral	Krehbiel et al. 1995
Novillos para carne	adaptadas consumo de TMR	ayuno de 8 horas	25% de la cantidad de MS de dieta TMR medida el día anterior fue reemplazado con una cantidad igual de grano (50% trigo:50% cebada molida)	oral	Keunen et al. 2002
Vacas Holstein	cinco semanas recibieron dieta TMR <i>ad libitum</i> con proporción de forraje y concentrado de 50:50		sustitución del 21% de MS <sup>4</sup> de la TMR por pellets con 50% trigo y 50% cebada, relación forraje : concentrado de 40:60	oral	Colman et al. 2013
Vacas Holstein	una semana recibieron un TMR formado por 50% concentrado y 50% heno de alfalfa picado		heno de alfalfa fue reemplazado gradualmente por pellets de alfalfa a un ritmo de 8 % por semana	oral	Colman et al. 2013

---

*PV*<sup>1</sup>: Peso vivo animal; *TMR*<sup>2</sup>: Ración Totalmente mezclada; *CMS*<sup>3</sup>: Consumo de materia seca, *MS*<sup>4</sup>: Materia Seca.

Hasta el momento no hay reportes de ensayos en los que el ayuno en sí mismo represente el desencadenante de la situación de acidosis. En cambio, el ayuno se ha utilizado como una herramienta para estimular el consumo de la dieta inductora de acidosis (Cuadro I). La aplicación de ayuno ha sido una forma de incrementar el volumen y velocidad de consumo de la dieta con mayor concentración energética. En este trabajo se empleó un nuevo modelo de inducción de SARA, el complejo ayuno-realimentación, sin modificaciones cualitativas ni cuantitativas de la dieta pre y post ayuno.

## 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos años, en Uruguay, se ha visto incrementado el crecimiento de los rubros forestación y agricultura, lo que ha provocado un nivel creciente de competencia por la tierra para su explotación. Frente a esta situación los sistemas productivos se han visto obligados a implementar un proceso de intensificación. La ganadería nacional ha experimentado un notorio cambio, donde una porción de los sistemas íntegramente pastoriles ha sido reemplazada por sistemas de tipo más intensivos, los encierres a corral (DIEA, 2011; DIEA, 2015). En la misma dirección, la apertura de nuevos mercados demandantes de carne de calidad superior ha fomentado la recría y engorde a corral. Del total de animales faenados en Uruguay durante el año 2013, el 10% de los mismos procedieron de encierros comerciales (Banchemo et al. 2016). Este nuevo nicho comercial ha planteado exigencias en cuanto al grado de terminación de los animales que implica el uso de dietas con mayor concentración energética (dietas con nivel mínimo de 62% de concentrados y EM superior a 12,26 MJ/kg de MS), disminuyendo el nivel de fibra y la concentración proteica. El nivel de consumo de este tipo de alimento debe ser al menos un 1,4% del PV (Diario Oficial de la Unión Europea, 2012).

En estos sistemas de producción intensiva se producen condiciones propicias para una serie de patologías con impacto negativo no sólo económico, sino también desde el punto de vista del bienestar animal. Los trastornos que se producen se asocian principalmente al tipo de dieta, al hacinamiento de los animales y a errores de manejo. En los sistemas de engorde a corral de Uruguay la mayoría de los problemas sanitarios derivan fundamentalmente de la alimentación, donde la acidosis aguda es el problema clínico más diagnosticado (34% de los establecimientos) y es responsable de casi la mitad de las muertes (Banchemo et al. 2016). Si bien el diagnóstico de la forma subclínica de la acidosis es complejo por presentar signos clínicos sutiles, se estima que, por cada animal con acidosis clínicamente manifiesta, coexisten cerca de 100 casos de SARA que pasan desapercibidos (T.G. Nagaraja, comunicación personal).

Si bien ambas formas de acidosis pueden causar pérdidas económicas significativas (Nocek, 1997), las pérdidas clínicas concentran la preocupación por parte de los productores, sin percibir que las mermas subclínicas, expresadas como menos masa ganada y extensión en el tiempo de engorde, pueden llegar a ser más cuantiosas (Smith, 1998). Bajo condiciones nacionales aún no se conoce la incidencia de la acidosis ruminal subaguda, pero se estima que su prevalencia es elevada conociendo el alto porcentaje de aparición de la forma clínica de esta patología.

Algunos de los aspectos de manejo que hacen que los animales no tengan una tasa de consumo regular pueden asociarse con una mayor incidencia de SARA (Krause y Oetzel, 2006). Dentro de estos aspectos se puede incluir la imposibilidad de la distribución del alimento por imprevistos, las dificultades en el desplazamiento de los animales (por ejemplo debido a la acumulación de barro), el traslado para procedimientos y la heterogeneidad del rodeo que favorece el establecimiento de jerarquía social. En estas situaciones se producen periodos de ayuno de diferente magnitud que podrían ocasionar episodios de SARA

Actualmente en Uruguay los encierros comerciales están siendo ocupados a la mitad de su potencial de alojamiento, esta capacidad ociosa puede ser aprovechada a mediano o largo plazo, representando una oportunidad de desarrollo económico muy importante. Frente a estas perspectivas promisorias es necesario el desarrollo de conocimiento que brinde herramientas frente a esta patología. Uruguay, como país principalmente exportador, debe tender a obtener producciones intensivas cada vez más seguras, sin perder los objetivos productivos contemplando el bienestar de los animales, aspecto de creciente interés a nivel mundial por sus implicancias éticas y por cómo repercuten estas consideraciones en el consumidor final. Por tal motivo, la salud animal en los encierros debe ser prioridad al momento de ofrecer nuestras carnes a mercados extranjeros.

El presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar el efecto del ayuno sobre la aparición de acidosis subaguda en bovinos en sistemas de engorde a corral en la etapa de terminación. Se buscó generar conocimiento científico local explorando a partir de qué intensidad el ayuno podría afectar significativamente parámetros animales lo que podría condicionar la performance obtenida. Hasta el momento no existe información sobre este aspecto en condiciones experimentales ni productivas en la bibliografía científica internacional. El estudio fue diseñado para analizar experimentalmente tres intensidades de restricción al alimento, como una forma de aproximación para poder identificar la extensión de ayuno de la cual los animales logran reponerse sin consecuencias negativas aparentes, y a partir de cuál severidad, el ayuno se vuelve un problema afectando el comportamiento productivo, la eficiencia metabólico-digestivo, y acciona como desencadenante de SARA con las consecuentes pérdidas. Para cumplir con el objetivo planteado, se desarrolló y se comprobó experimentalmente un nuevo modelo de inducción de SARA, la aplicación del complejo ayuno-realimentación.

## **6. HIPÓTESIS**

El ayuno aplicado a bovinos en etapas finales de engorde (terminación) determina adaptaciones comportamentales durante la realimentación que actuarán como desencadenantes de episodios de SARA.

## **7. OBJETIVOS**

Evaluar el efecto de tres niveles de ayuno como inductor de SARA en novillos en engorde a corral bajo una dieta con alto nivel de concentrado.

### **7.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar el comportamiento ingestivo y ritmo de ingestión de TMR durante la realimentación.
- Analizar el ambiente ruminal mediante dinámica de pH, concentración de ácidos grasos volátiles, ácido láctico y N-NH<sub>3</sub>.
- Estudiar la evolución de la concentración de hormonas, metabolitos, enzimas hepáticas y proteínas de fase aguda como la haptoglobina.

## **8. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN**

Se realizó un experimento *in vivo* en un modelo experimental con novillos Hereford en etapa de engorde de terminación. Los animales fueron sometidos durante 43 días a la habituación al manejo e instalaciones. Posteriormente durante un período de 21 días se realizó la adaptación a la dieta concentrada hasta llegar al nivel de 85% de concentrado, posteriormente se aplicaron los tratamientos que consistieron en la privación absoluta de alimentos por una única vez durante 12, 24 o 36 horas. Se analizó el rol de la magnitud del ayuno como modelo inductor de SARA siguiendo tres evaluaciones: el comportamiento animal, el ambiente ruminal y el estado endócrino-metabólico.

## 9. MATERIALES Y MÉTODOS

### 9.1 ANIMALES Y CONDICIONES DE ALOJAMIENTO

El experimento se realizó en la Unidad de Lechería de la Estación Experimental “Alberto Boerger”, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), (S 34°29', O 57°44'), La Estanzuela, ubicado en paraje El Semillero, Departamento de Colonia, Uruguay, entre los meses de agosto y diciembre de 2014. Se utilizaron 20 novillos Hereford de 18-24 meses de edad y 379,4±6,4 kg PV, alojados individualmente en encierros a cielo abierto en corrales de igual superficie (10 m<sup>2</sup>) manejados en régimen de confinamiento. Los animales portaban un catéter ruminal permanente de polietileno (5 mm de calibre y 110 mm de longitud) y fueron asignados aleatoriamente a uno de cuatro tratamientos (n=5 por tratamiento). El manejo de los animales durante los procedimientos experimentales se desarrolló de acuerdo con los principios bioéticos y regulaciones establecidos para experimentación, investigación científica y enseñanza (Comisión Honoraria de Experimentación Animal (C.H.E.A.), UdelaR, Uruguay (Registro 0009/11) y la Comisión de Ética y Bienestar Animal del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Uruguay (Número de expediente: INIA 2014.38).

### 9.2 EXPERIMENTO

Se realizó un experimento *in vivo* con un diseño completamente al azar, con medidas repetidas en el tiempo realizadas sobre las mismas unidades experimentales. Durante 21 días los animales fueron sometidos a un período de adaptación a las condiciones experimentales y a la dieta. Durante este período la relación concentrado-forraje se incrementó paulatinamente hasta llegar a una proporción 85:15. La dieta fue administrada en dos ofertas diarias a las 08:00 y a las 15:00 horas y consistió en una TMR compuesta por ración comercial de engorde para bovinos (ERRO P12®, elaborador: Barraca Erro, Dolores, Soriano, Uruguay), *expeller* de girasol y heno de moha (*Setaria itálica*) como componentes principales según se especifica en el Cuadro II. Los análisis de composición química de alimentos se realizaron en el Laboratorio de Nutrición de INIA La Estanzuela, Uruguay. Se adicionó a la dieta 100 g/d de carbonato de calcio por animal. Todos los animales tuvieron acceso a agua y sales minerales *ad libitum*. La TMR se formuló de acuerdo a las recomendaciones de

NRC (2000) para cubrir requerimientos de animales de 380 kg de PV con objetivos de ganancia de peso promedio de 1,600 kg/animal/día en las etapas finales del engorde.

Luego de la fase de adaptación y durante 25 días, se realizó un ajuste de la cantidad de alimento ofrecida según el método “*slick bunk*” comedero lamido (Silva del Río et al. 2010). Antes de la primera oferta diaria de alimento se observó la existencia de rechazo de la oferta del día previo y se fue incrementando la oferta de TMR en los casos en que los animales no mostraban rechazos por tres días consecutivos. El primer ajuste de oferta fue del 5%, seguidos de incrementos sucesivos del 3%.

El período experimental correspondió a los últimos 10 días del encierro dónde se aplicaron los tratamientos de ayuno, se realizó la realimentación y se tomaron todas las muestras. El inicio del ayuno fue escalonado en los diferentes tratamientos con el objetivo de cumplir con las respectivas horas de ayuno y conseguir que todos los animales fuesen realimentados el mismo día. La composición de la dieta empleada fue la misma para la totalidad de los animales, y el volumen se ajustó según cada peso vivo.

**CUADRO II.** Composición química de los alimentos constituyentes de la TMR (media  $\pm$  DE)

	<b>MS</b> <sup>1</sup>	<b>PB</b> <sup>2</sup>	<b>FAD</b> <sup>3</sup>	<b>FND</b> <sup>4</sup>
Ración comercial (P12®)	88,57	11,79	15,06	23,97
Expeller girasol	88,52	31,3	43,65	51,28
Fardo moha <sup>5</sup>	96,22	3,45	58,46	78,53

*Análisis realizado en base seca, <sup>1</sup>MS: % de materia seca; <sup>2</sup>PB: proteína bruta (N x 6,25) como % de la MS; <sup>3</sup>FAD: fibra ácido detergente expresada como % de la MS, <sup>4</sup>FND: fibra neutro detergente utilizando amilasa termo-resistente y sulfito de sodio, expresada como % de la MS, <sup>5</sup>Fardo de moha: Setaria itálica en heno. \*Se adicionó a la dieta 100 g/d de carbonato de calcio por animal.*

La ración comercial de engorde (P12<sup>®</sup>) estaba constituida por los siguientes componentes: maíz, sorgo, cebada, afrechillo de trigo, pellets de soja, pellets de girasol y melaza.

Los tratamientos consistieron en la aplicación de un período de ayuno (horas de restricción absoluta al alimento) de diferente magnitud en un único momento del engorde seguido de realimentación según el esquema;

**Control (C):** sin ayuno

**T12:** ayuno por 12 horas

**T24:** ayuno por 24 horas

**T36:** ayuno por 36 horas

### 9.3 DETERMINACIONES

En la Figura 1 se presenta un esquema de la estrategia de investigación y las determinaciones realizadas.

#### 9.3.1 CONSUMO DE ALIMENTO

El consumo individual diario de alimentos se determinó durante todo el período experimental, por diferencia de peso entre la cantidad total de TMR ofrecida y la cantidad rechazada en veinticuatro horas [Consumo (g) = (g ofrecidos - g rechazados)].

#### 9.3.2 COMPORTAMIENTO ANIMAL

##### 9.3.2.1. *Comportamiento ingestivo*

En cada tratamiento, luego del ayuno y desde el momento de la realimentación se registró el comportamiento de cada animal cada 10 minutos durante las primeras 12 h de acceso al alimento mediante la técnica de "*scan-sampling*" según la metodología

propuesta por Hirata et al. (2002). La observación fue directa y las actividades de los animales se clasificaron en: **comer** (búsqueda del alimento, prehensión y masticación ingestiva), **rumiar** (masticación de bolo regurgitado) y **beber** (consumo de agua). Se tomó la frecuencia relativa promedio por hora de cada una de las actividades y el tiempo total dedicado a cada actividad.

#### 9.3.2.2. Ritmo de ingestión

Durante la realimentación se registró el ritmo de ingestión o tasa de consumo del alimento de cada animal, mediante el registro de la cantidad de alimento ofrecido y rechazado cada 30 minutos por un período de 5 horas a partir del inicio de la ingesta. La ingesta de MS acumulada durante las primeras 5 horas en relación al tiempo experimental 0 h (realimentación), se calculó como la suma de las cantidades de MS ingeridas en cada registro.

### 9.3.3 AMBIENTE RUMINAL

#### 9.3.3.1. pH ruminal, AGV y $N-NH_3$

El pH ruminal de todos los animales se midió en las etapas de pre-ayuno y post-ayuno en los tiempos experimentales -54, -48, -42, -36, -30, -34, -18, -12, -10, -8, -6, -4, -2, 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156, 168 y 180 h (Figura 1). Fue medido directamente del líquido ruminal colectado a través de las sondas ruminales de manera inmediata a la obtención, empleando un pHmetro digital (EW-05991-36, Cole Parmer, Illinois, EE.UU).

Para el análisis de la concentración de los AGV (acético, propiónico, butírico) y de ácido láctico, se colectaron muestras de líquido ruminal en los tiempos experimentales -42, -36, -30, -24, -18, -12, -8, -6, -4, 0, 2, 4, 8, 12, 24 h, teniendo como referencia la hora 0 como momento de la realimentación. Las muestras de 1 ml de líquido ruminal se mezclaron con un 1 ml de ácido perclórico 0,1 M como conservante (50:50, V/V). La detección de los AGV se realizó en cada muestra mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, Dionex UltiMate 3000®, Dionex Corporation, Sunnyvale, EE.UU) con columna Acclaim de 300 x 7,8

mm (Rezex ROA-Organic Acid H<sup>+</sup> (8%), Phenomenex, EE.UU), según la técnica desarrollada por Adams et al. (1984). La suma de la concentración individual de los ácidos acético, propiónico y butírico fue tomada como la concentración de AGV totales y se calculó la relación entre la concentración de ácido acético y propiónico (A/P).

Para determinar la concentración de N-NH<sub>3</sub> se colectó una muestra de líquido ruminal en los tiempos experimentales -42, -30, -24, -18, -12, -6, 0, 2, 4, 8, 12, 24 h. Una alícuota de 10 mL de líquido ruminal se conservó con 0,2 mL de ácido sulfúrico (50%) y se conservó a -20 °C hasta su posterior análisis. Se empleó la técnica Fenol-Hipoclorito (Weatherburn, 1967) basada en un método colorimétrico. Las muestras fueron analizadas en un espectrofotometro (Unico 1200 series, United Products y Instruments, Inc, NJ, EE.UU) y cada muestra se analizó por triplicado.

#### 9.3.4 HORMONAS, METABOLITOS Y ENZIMOGRAMA HEPÁTICO

Durante todo el período de ayuno y realimentación se tomaron muestras de sangre por venopunción yugular de todos los animales. La determinación de glucosa y urea se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Suelos y Agua de INIA La Estanzuela. Los análisis de insulina, AGNE y haptoglobina se llevaron a cabo en el Laboratorio de Técnicas Nucleares (LTN), mientras que los análisis de concentración de albúmina ALP, Bilirrubina total, Colesterol, GGT, Globulinas, GOT-AST y Proteína total se realizaron en el Laboratorio de Análisis Clínicos, ambos laboratorios pertenecientes a Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Se determinó la concentración de glucosa en muestras correspondientes a los tiempos experimentales -19, -15, -11, -7, -3, -1, 5, 17, 29 y 41 h. Las muestras se tomaron en tubos con fluoruro de sodio y oxalato de potasio como anticoagulante (BD Vacutainer®, Franklin Lakes, NJ, EE.UU), se centrifugaron inmediatamente (3000 rpm, 15 min) y el plasma así obtenido se conservó a -20°C hasta su procesamiento. Se determinó glucosa por colorimetría usando un kit comercial (BioSystems S.A., Costa Brava 30, Barcelona España), el límite de detección fue de 0,23 mg/dL (0,0126 mmol/L). Las muestras se analizaron por duplicado usando un espectrofotómetro Unico 1200 series (United Products y Instruments, Inc, NJ, EE.UU.).

Para las determinaciones de insulina, urea, AGNE (ácidos grasos no esterificados) y haptoglobina las muestras de sangre se colectaron en tubos secos sin anticoagulante

para extracción de suero. El suero obtenido luego de la centrifugación a 3000 rpm por 15 min se conservó a -20°C hasta su procesamiento.

La concentración de insulina se determinó en los tiempos experimentales -19, -15, -11, -7, -3, -1, 5, 17, 29 y 41 h, por medio de un kit inmunoradiométrico (RIA - DIASource Immuno Assays S.A, Nivelles, Bélgica). La sensibilidad del ensayo fue 0,76  $\mu$ UI/mL.

La determinación de urea en los tiempo -19, -15, -11, -7, -3, -1, 5, 17, 29 y 41 h, se realizó por colorimetría usando un kit comercial (BioSystems S.A., Costa Brava 30, Barcelona España), el límite de detección fue de 1,3 mg/dL (0,21 mmol/L). Las muestras se analizaron por duplicado usando un espectrofotómetro Unico 1200 series (United Products y Instruments, Inc, NJ, EE.UU).

La concentración de AGNE se midió en los tiempos -19, -15, -11, -7, -3, -1, 5, 17, 29 y 41 h usando el método colorimétrico de punto final Acetil CoA sintetasa -Acetil CoA oxidasa (ACS ACOD), se empleó un kit comercial (WAKO Pure Chemical Industries Ltd. Japón), medido en espectrofotómetro, Vitalab Selectra II, la concentración mínima detectable fue de 0,01mmol/L.

La determinación de haptoglobina se realizó en los tiempos experimentales -7, -3, -1, 5, 9, 17, 29 y 41 h. Se empleó un kit comercial (Haptoglobin kit, Tridelta Development Ltd.) Se realizó por método colorimétrico, utilizando un lector de microplaca Thermo Electron Corporation, Multiscan EX. La sensibilidad analítica fue de 0,005 mg/mL. Las muestras se analizaron por duplicado midiendo los valores de absorbancia a 630nm en un lector Thermo Electron Corporation, Multiscan EX.

Para los análisis de las enzimas y metabolitos hepáticos se usaron tubos con gel como separador físico (BD Vacutainer® SST™, Franklin Lakes, NJ, EE.UU). Se analizaron los tiempos -40, -19, -15, -7, -3, -1, 5, 17, 29 y 41 h. Se determinaron las enzimas y metabolitos: Albúminas (Webster, 1977), Fosfatasa alcalina (ALP) (Tietz et al. 1983), Bilirrubina Total (Brodersen y Vind 1963), Colesterol (Abell et al. 1952), Gamma glutamil transpeptidasa (Gamma GT) (Persijn y van der Slik 1976), Globulinas (Debro et al. 1957), Transaminasa glutámico-oxalacética (GOT) (Bergmeyer et al. 1986) y Proteínas Totales (Lowry et al. 1951).

## 9.4 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de ritmo de ingestión, valores medios de pH, AGV y N-NH<sub>3</sub> ruminales, glucosa, urea, insulina, AGNE, haptoglobina y enzimograma hepático fueron comparados usando el procedimiento PROC MIXED, SAS, (Statistical Analysis System, Institute Inc., Cary, NC, EE.UU, Versión 9.4). Los datos se analizaron en un diseño completamente al azar con un modelo de medidas repetidas en el tiempo sobre cada animal. El modelo incluyó como efecto aleatorio al animal y como efectos fijos al período, tratamiento, tiempo y la interacción tratamiento por tiempo, según el modelo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + H_j + (TxH)_{ij} + e_{ij},$$

donde  $Y_{ij}$  es la variable respuesta en estudio,  $\mu$  es la media general,  $T_i$  es el efecto fijo tratamiento,  $H_j$  el efecto fijo hora,  $(TxH)_{ij}$  el efecto fijo interacción tratamiento por tiempo y  $e_{ij}$  es el error residual. Para cada variable se estudió la mejor estructura de los errores según el criterio de información bayesiano (BIC). Todos los resultados se presentan como medias de cuadrados mínimos  $\pm$  error estándar de la media (ESM) a menos que se especifique. En todos los análisis se informó la significancia cuando probabilidad  $P \leq 0,05$ . Las variables de comportamiento fueron analizadas ajustando un modelo lineal generalizados de medidas repetidas en el tiempo a través del procedimiento GLIMMIX del paquete estadístico SAS (Versión 9.4, SAS Institute, Cary, NC). Se realizó un análisis de correspondencia entre los tratamientos y las categorías de comportamiento ingestivo, lo que permitió evaluar la relación existente entre estas variables categóricas, así como también entre los niveles de las mismas, permitiendo identificar las asociaciones de mayor o menor peso entre los niveles de las variables cualitativas.

	PREAYUNO	AYUNO	R	POSAYUNO
Comportamiento Ingestivo				
Ritmo de ingestión				
pH ruminal				
AGV y ácido láctico				
N-NH <sub>3</sub>				
Haptoglobina				
Hormonas y metabolitos				
Funcional hepático				

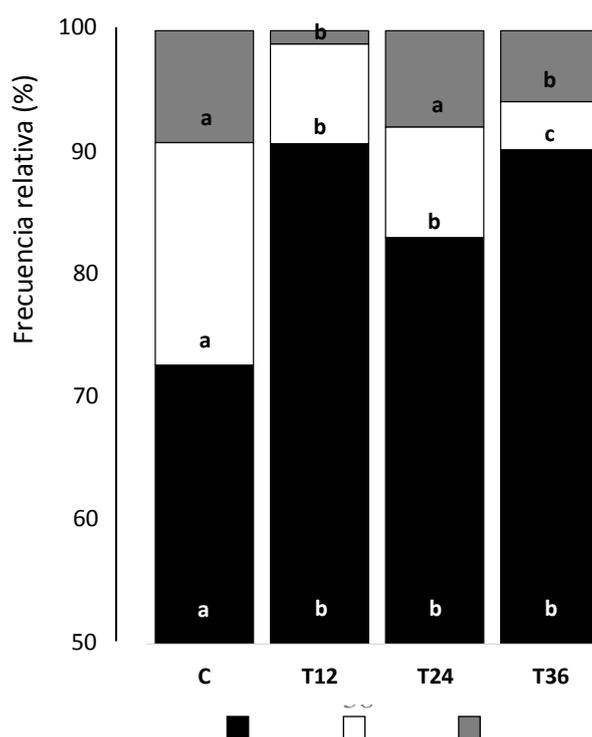
-54 -48 -42 -40 -36 -30 -24 -19 -18 -15 -12 -11 -10 -9 -8 -7 -6 -5 -4 -3 -2 -1 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 17 18 20 24 29 30 32 36 41 42 44 48 54 60 72

**Figura 1.** Esquema general de las actividades del muestreo. Nota: a partir del tiempo 60 h se registró pH ruminal cada 12 horas hasta el tiempo experimental 180 h. R: Realimentación (0 hora), *Hormonas y metabolitos* incluye: Glucosa, Insulina, AGNE y Urea. *Funcional hepático* incluye: Albúminas, Fosfatasa alcalina (ALP), Gamma glutamil transpeptidasa (Gamma GT), Transaminasa glutámico-oxalacética (GOT), Bilirrubina Total, Globulinas, Colesterol y Proteína Total.

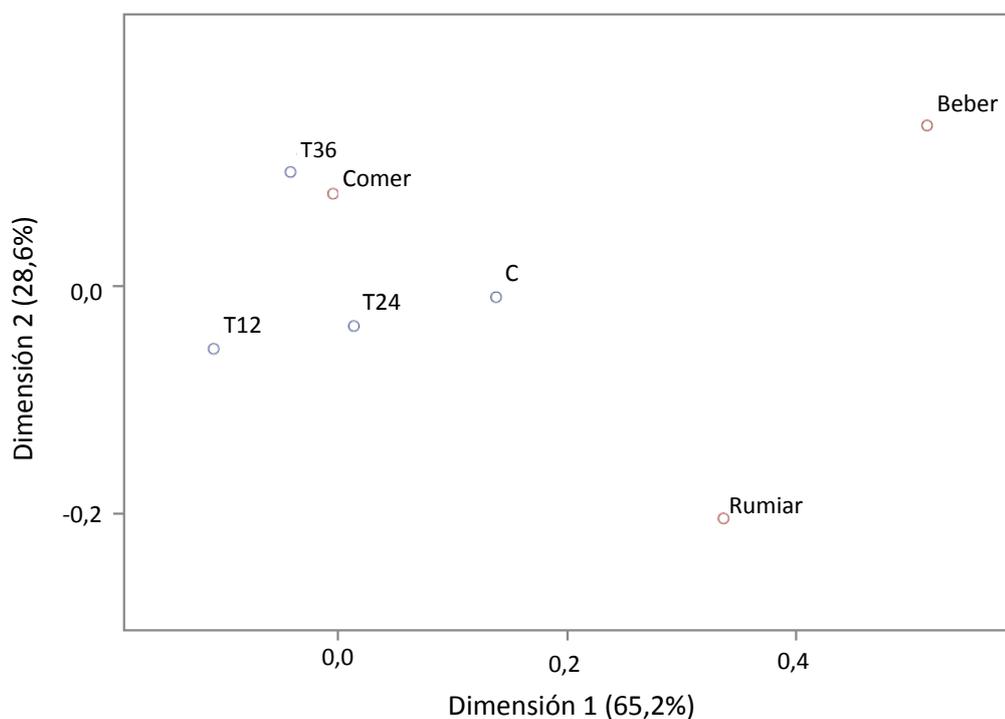
## 10.RESULTADOS

### 10.1 COMPORTAMIENTO INGESTIVO Y RITMO DE INGESTIÓN

En la Figura 2 se presentan los resultados relacionados al comportamiento ingestivo durante la etapa de realimentación. El ayuno afectó el comportamiento ingestivo de los animales ( $P=0,042$ ). Los animales sometidos a ayuno fueron observados con mayor frecuencia ingiriendo TMR en comparación al grupo control. Los novillos de los grupos T12, T24 y T36 dedicaron más tiempo a la ingesta de alimento en detrimento de otras actividades como rumia o la ingesta de agua. El grupo T36 destinó el menor tiempo a la rumia ( $P\leq 0,05$ ), comparado con los restantes tratamientos. No hubo diferencia ( $P=0,07$ ) para consumo de agua entre el grupo control C y T24.



**Figura 2.** Frecuencia relativa (%) para las actividades de ingestión de alimento (Comer), rumiar e ingestión de agua (Beber), durante las primeras 12 horas luego de la realimentación (hora 0). Grupo control (C), ayuno de 12 horas (T12), ayuno de 24 horas (T24) y ayuno de 36 horas (T36). Letras diferentes para una misma actividad en tratamientos diferentes indican diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ).

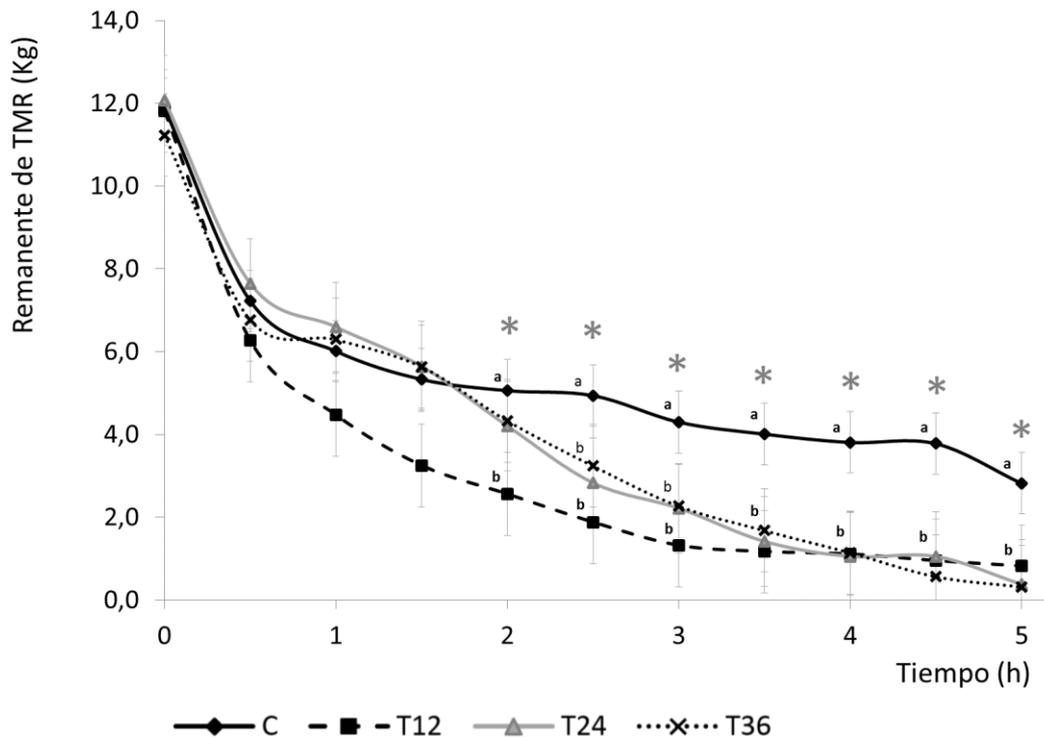


**Figura 3.** Análisis de Correspondencia entre los tratamientos y el comportamiento ingestivo durante las primeras 12 horas desde la realimentación (0 hora). Grupo control (C), ayuno de 12 horas (T12), ayuno de 24 horas (T24) y ayuno de 36 horas (T36).

En la Figura 3 se presenta un análisis de correspondencia que vincula los tratamientos aplicados con el comportamiento animal registrado durante las primeras horas desde la realimentación. Los tratamientos sometidos a ayuno se relacionaron fuertemente con la actividad de ingestión, mientras que el grupo control no estuvo estrechamente vinculado a una actividad específica.

La dinámica de ingestión de la TMR de los animales en las primeras 5 h desde la realimentación (hora 0) se muestra en la Figura 4. Todos los animales se alimentaron con un ritmo similar de ingestión hasta el tiempo 2 h desde la realimentación ( $P=0,08$ ). Luego, la ingestión del grupo control se desaceleró mientras que el ritmo de ingestión de los animales en los tratamientos sometidos a ayuno se mantuvo. La tasa de ingestión fue significativamente mayor ( $P \leq 0,05$ ) en todos los animales

sometidos a ayuno, sin que existieran diferencias dentro de estos tratamientos. Al tiempo experimental 5 h los animales de los tratamientos T12, T24 y T36 consumieron todo el alimento ofrecido mientras que los animales del grupo control no consumieron toda la oferta de alimento en ese lapso de tiempo.

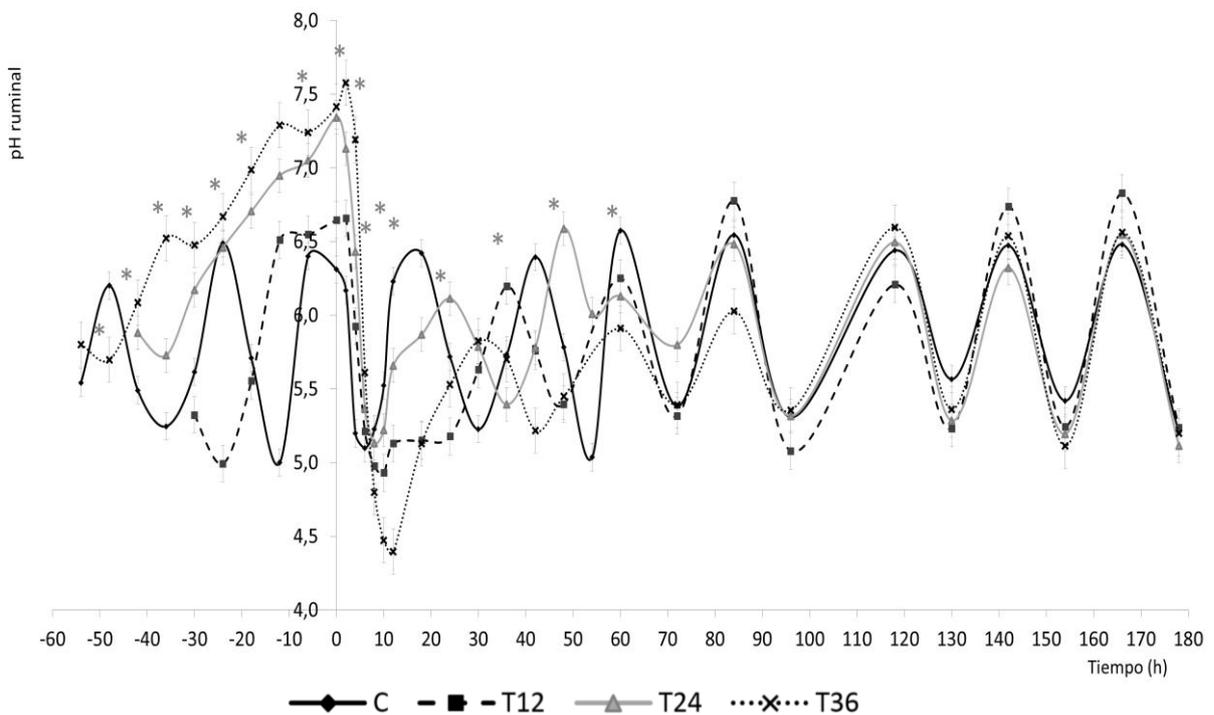


**Figura 4.** Ritmo de ingestión de TMR en etapa de realimentación de novillos sometidos a ayuno (media  $\pm$  ESM – Error estándar de la media), grupo control (C), ayuno de 12 horas (T12), ayuno de 24 horas (T24) y ayuno de 36 horas (T36). \* Indican diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ), letras diferentes en un mismo tiempo indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0,05$ ).

## 10.2 EVOLUCIÓN DE pH RUMINAL, AGV, ÁCIDO LÁCTICO Y N-NH<sub>3</sub>

El ayuno modificó la dinámica del pH ruminal observándose, por un lado, efecto significativo del tratamiento (nivel de ayuno,  $P \leq 0,05$ ) así como interacción tratamiento x tiempo ( $P \leq 0,05$ ). Las diferencias significativas en los diferentes

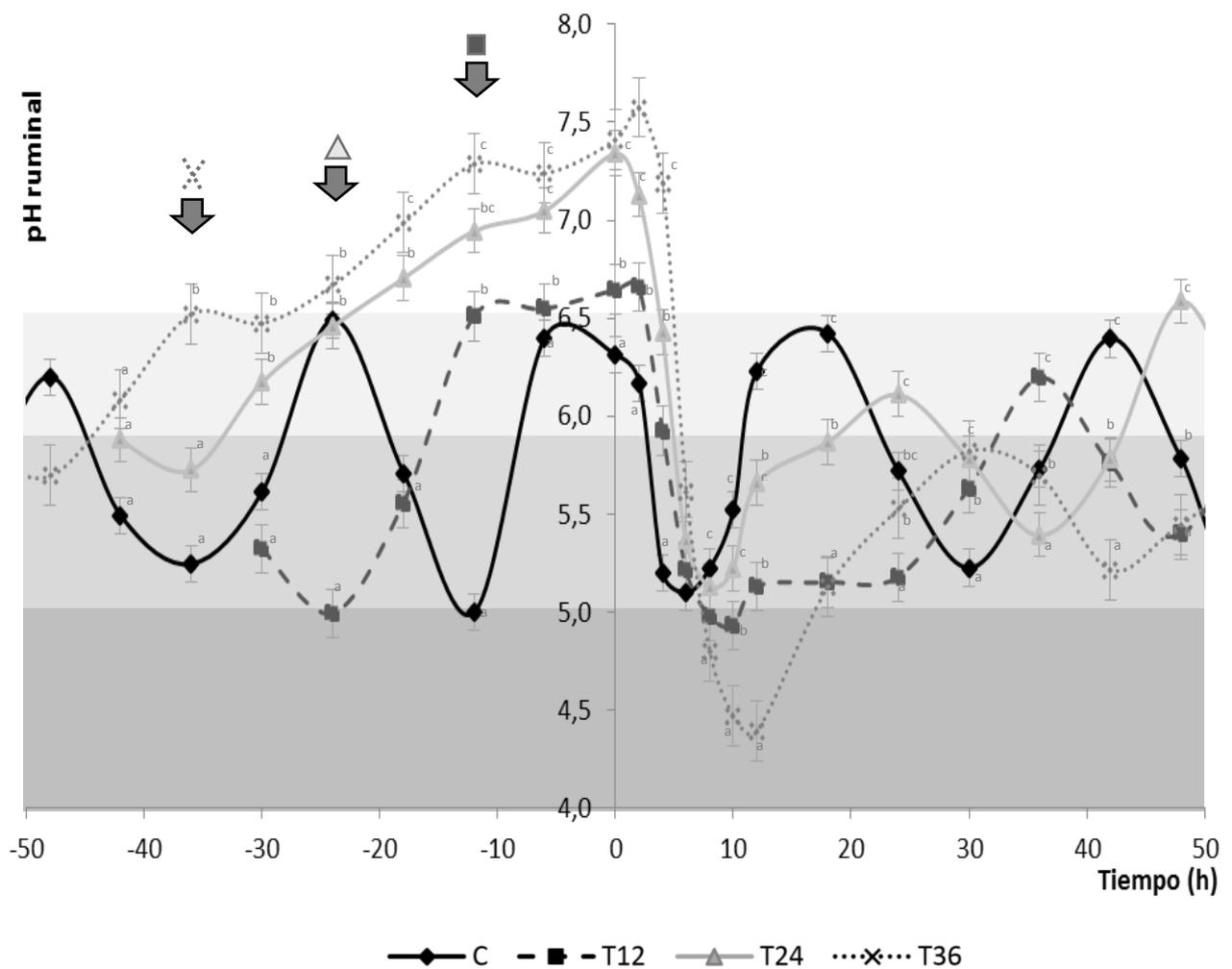
tiempos experimentales se muestran en la Figura 5. Luego de transcurridas 70 h desde la re-alimentación todos los tratamientos presentaron patrones y valores de pH ruminal similares ( $P>0,05$ ) (Figura 5 y Figura 6).



**Figura 5.** Dinámica del pH ruminal de los animales en los distintos tratamientos, durante etapa pre-ayuno y realimentación (hora 0) (media  $\pm$  ESM). Grupo control (C), ayuno de 12 horas (T12), ayuno de 24 horas (T24) y ayuno de 36 horas (T36). \* Indican diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ).

Los animales en el grupo control mostraron un patrón ondulante y homogéneo del pH ruminal, con caídas y recuperaciones luego de cada suministro de comida (Figura 5 y 6) a lo largo de todo el periodo experimental. Sin embargo, los animales en los distintos tratamientos de ayuno mostraron, durante la etapa de ayuno, incrementos progresivos del pH llegando incluso a pH alcalino (T12: 6,64, T24: 7,34, T36: 7,41 a

la hora 0 de realimentación, Figura 6). Una vez realimentados y en un lapso de 12 h, los animales sufrieron un marcado descenso del pH ruminal, con caídas en promedio de 1,7 unidades de pH en el tratamiento T12 y de 2,1 unidades de pH en el tratamiento T24 al tiempo 10 h de la realimentación.



**Figura 6.** Dinámica del pH ruminal de los animales en los distintos tratamientos, durante etapa pre-ayuno y realimentación (0 hora) hasta el tiempo experimental 49 h (media ± ESM). Grupo control (C), ayuno de 12 horas (T12), ayuno de 24 horas (T24) y ayuno de 36 horas (T36). Franjas de colores:  $6,5 \leq pH < 5,8$  pH normal para animales con consumo alto de concentrados,  $5,8 \leq pH < 5,0$ : SARA,  $pH \leq 5,0$ : acidosis ruminal aguda. \* Indican diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ), letras diferentes en un mismo tiempo indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0,05$ ).

En el tratamiento T36 el descenso promedial del pH fue aún más pronunciado, alcanzando 3 unidades de magnitud al tiempo 12 h luego de la realimentación. En ese momento se registraron los valores mínimos de pH ruminal en todos los animales sometidos a ayuno (T12: 4,9, T24: 5,2 y en T36: 4,5; figuras 5 y 6).

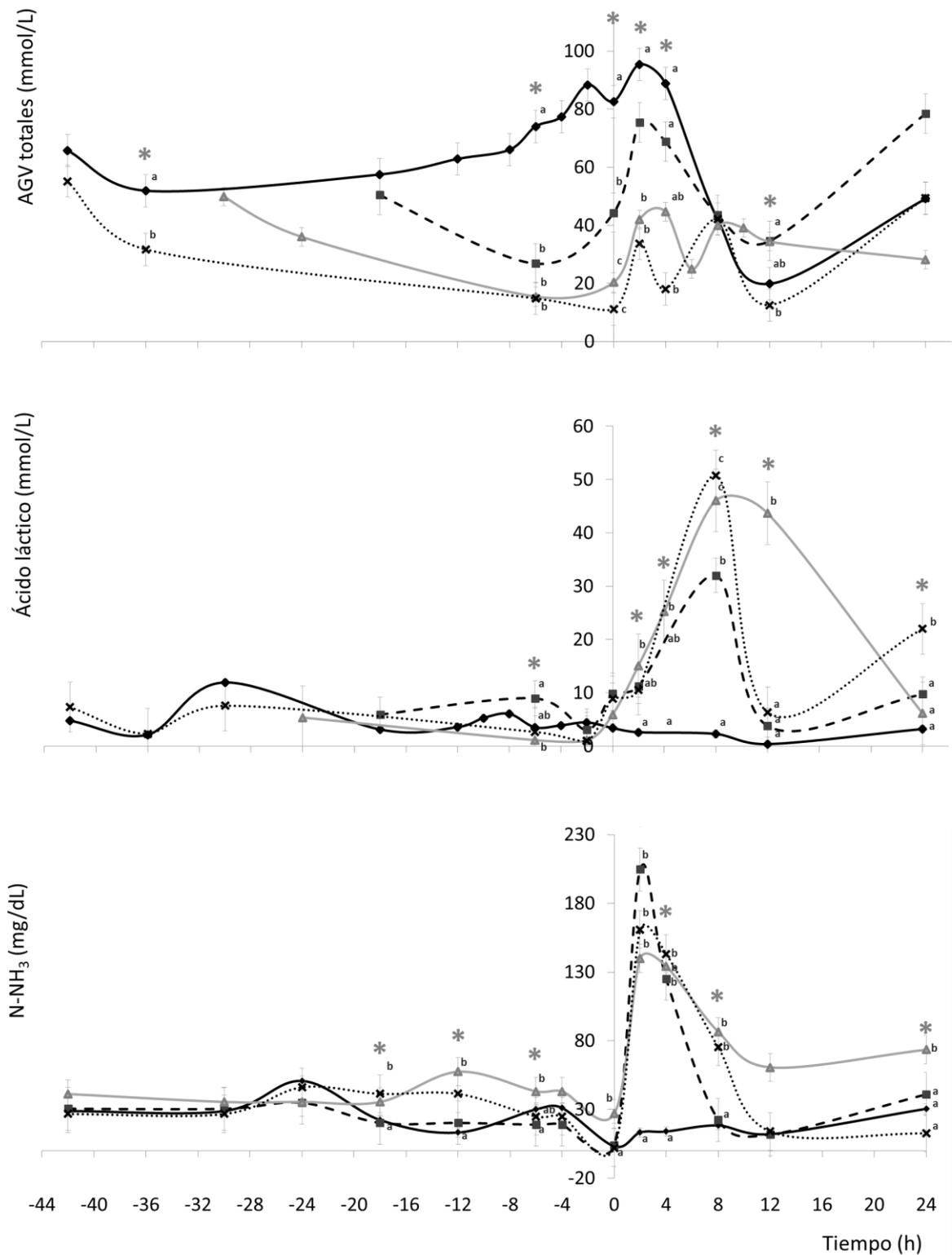
En la Figura 7 se presentan los resultados de la dinámica de concentración ruminal de AGV totales, ácido láctico y N-NH<sub>3</sub>. La aplicación de ayuno afectó significativamente la concentración de estos tres parámetros en los diferentes tratamientos ( $P \leq 0,05$ ), además del efecto tiempo se observó interacción tratamiento x tiempo ( $P \leq 0,05$ ) para estas tres variables.

Durante el ayuno los tratamientos T12, T24 y T36 presentaron niveles de AGV totales significativamente más bajos que el tratamiento control ( $P=0,001$ ), los valores medios para los diferentes tratamientos fueron, grupo control: 74,0 mmol/L, T12: 26,8 mmol/L, T24: 15,4 mmol/L y en T36: 14,8 mmol/L. Inmediato a la realimentación la concentración de AGV en los tratamientos sometidos a ayuno se incrementó llegando en T24 a 42,0 mmol/L y en T36 a 33,6 mmol/L. Sin embargo, los niveles de AGV en T24 y T36 fueron significativamente menores que en el grupo control ( $P=0,003$ ), al tiempo que no existió diferencia entre T12 y grupo control, 75,3 mmol/L y 95,4 mmol/L respectivamente. Este aumento inicial en la concentración de AGV en los tratamientos sometidos a ayuno se detuvo entre el tiempo 2 h y 4 h. En este momento solo T36 mostró niveles de AGV más bajos que el grupo control (T36: 18,0 mmol/L y control: 88,7 mmol/L). Luego de transcurridas 24 h desde la realimentación ya no se registraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $P=0,248$ ).

La concentración de ácido láctico se incrementó de forma marcada en la etapa posterior a la realimentación en los animales de los tratamientos sometidos a ayuno ( $P=0,05$ ). Luego de transcurridas 4 h desde la realimentación se pudo observar un progresivo aumento en la concentración ruminal de este ácido que alcanzó niveles máximos en todos los tratamientos a las 8 h. La concentración máxima de ácido láctico fue de 32,0 mM en los animales del T12, 48,0 mM en T24 y 51,0 mM en los animales del tratamiento T36, al tiempo que en el grupo control el nivel de ácido láctico fue de 2,2 mM. En los animales del T12 y T36 la concentración de ácido láctico disminuyó rápidamente siendo similar al control luego de transcurridas 12 h pos-realimentación, sin embargo, los animales en el T24 mostraron una disminución más lenta manteniendo concentraciones elevadas durante más tiempo ( $P=0,05$ , Figura 7). En el tratamiento T36 se registró un segundo incremento de ácido láctico en el tiempo 24 h, no tan marcado como el pico inicial, pero su concentración en este

punto fue mayor que en los restantes tratamientos ( $P=0,012$ ) (valores medios en grupo control: 3,1 mM, T12: 9,7 mM, T24: 6,1 mM y T36: 21,9 mM).

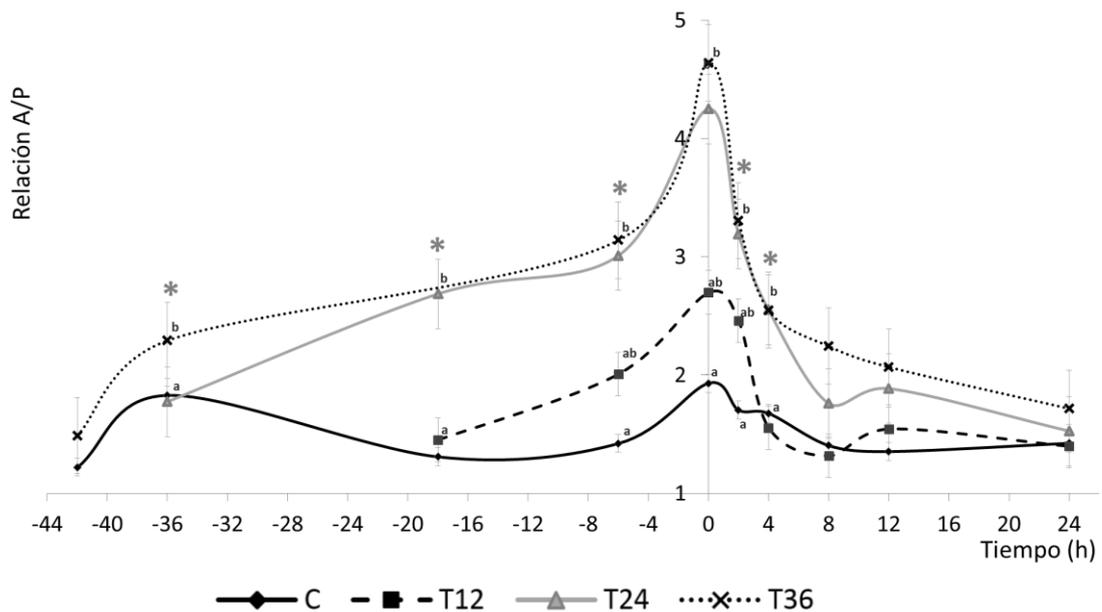
En la etapa previa al ayuno las concentraciones de N-NH<sub>3</sub> en todos los tratamientos fueron siempre menores a 50 mg/dL, llegando a los niveles más bajos a medida que las horas de ayuno se acumulaban en cada tratamiento. En esta etapa las concentraciones medias de N-NH<sub>3</sub> registradas fueron significativamente diferentes sólo en el grupo T24 al compararlas con los otros tratamientos ( $P=0,03$ ).



**Figura 7.** Concentración de AGV totales (mmol/L), Ácido láctico (mmol/L) y N-NH<sub>3</sub> (mg/dL), de los animales en los distintos tratamientos (media  $\pm$  ESM), durante etapa pre-ayuno y realimentación (hora 0) hasta el tiempo 24 h. Grupo control (C), ayuno de 12 horas (T12), ayuno de 24 horas (T24) y ayuno de 36 horas (T36). \* Indican diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ), letras diferentes en un mismo tiempo indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0,05$ ).

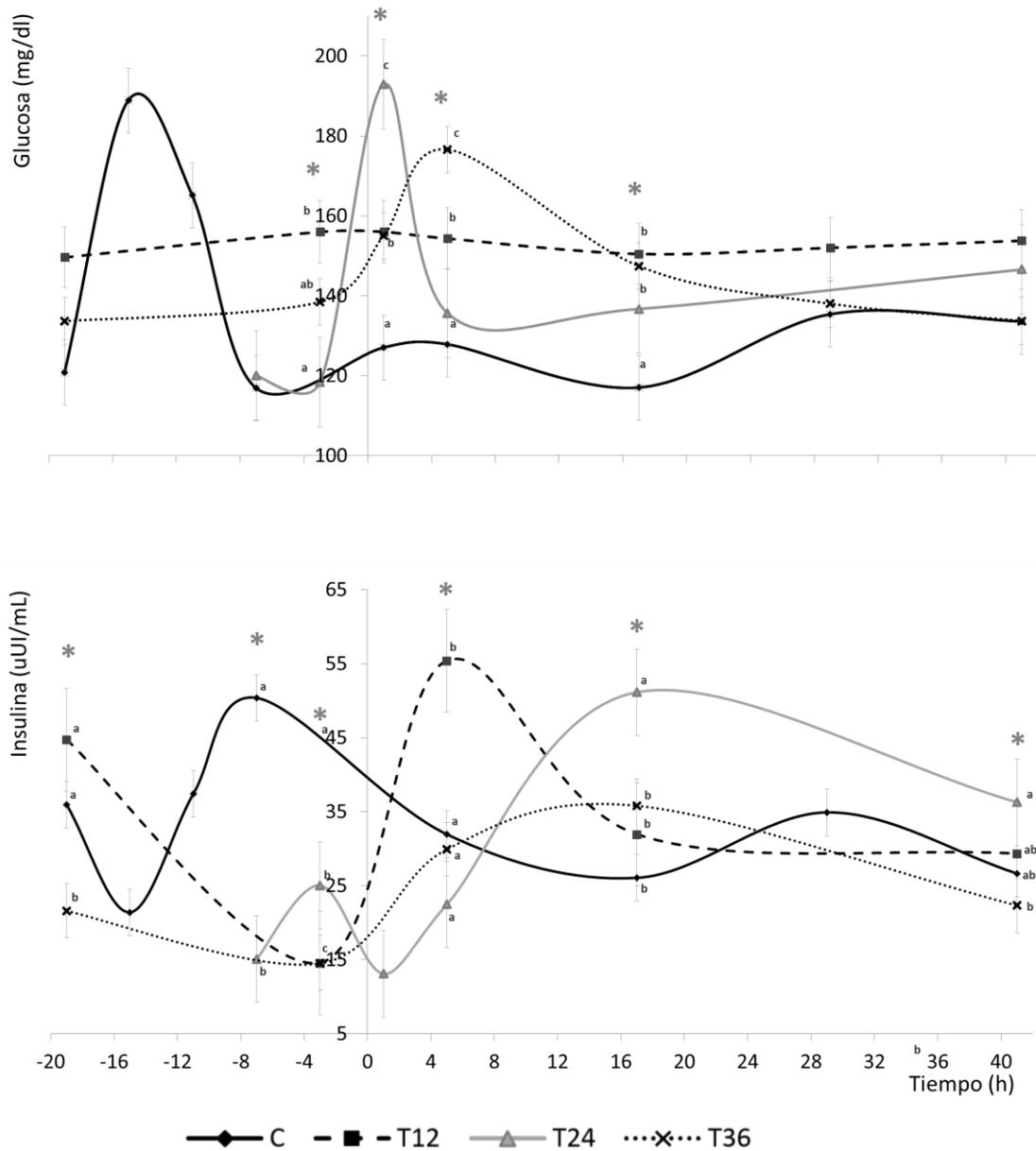
Luego de la realimentación, la concentración de N-NH<sub>3</sub> alcanzó sus niveles máximos a los tiempos 2 y 4 h en todos los tratamientos sometidos a ayuno (valores máximos T12: 204,7 mg/dL, T24: 139,9 mg/dL y T36: 160,9 mg/dL). En este punto la concentración de N-NH<sub>3</sub> entre los tratamientos restringidos y el grupo control fue diferente llegando a 168,5 mg/dL en promedio para los tratamientos con ayuno y 13,3 mg/dL en el control (P=0,006). Los niveles de N-NH<sub>3</sub> descendieron rápidamente y luego de transcurridas 24 h desde la realimentación los niveles en todos los tratamientos fueron similares salvo en el tratamiento T24 donde el nivel de N-NH<sub>3</sub> se mantuvo elevado (P=0,041), valores medios de N-NH<sub>3</sub>: control: 30,6 mg/dL, T12: 41,1 mg/dL, T24: 73,4 mg/dL y T36: 12,7 mg/dL.

En la Figura 8 se presenta la relación entre los ácidos acético y propiónico. Al analizar este parámetro se pudo observar un efecto significativo de la aplicación del ayuno (P≤0,05) así como un efecto del tiempo e interacción tratamiento x tiempo. Durante la fase de ayuno y a medida que las horas de restricción se acumularon hasta hacerse máximas en cada tratamiento, la relación A/P se incrementó. Una vez realimentados se observó una rápida disminución de la relación A/P en T12, T24 y T36.



**Figura 8.** Relación entre ácido acético y ácido propiónico (A/P) en el líquido ruminal de los animales en los distintos tratamientos, durante etapa pre-ayuno y realimentación (hora 0) (media ± ESM; n=20). Grupo control (C), ayuno de 12 horas (T12), ayuno de 24 horas (T24) y ayuno de 36 horas (T36). \* Indican diferencias significativas (P≤0,05), letras diferentes en un mismo momento de muestreo indican diferencias significativas entre tratamientos (P≤0,05).

### 10.3 EVOLUCIÓN DE HORMONAS Y METABOLITOS



**Figura 9.** Dinámica de glucosa (g/dL) e insulina (uUI/mL) de los animales en los distintos tratamientos, durante etapa pre-ayuno y realimentación (hora 0) (media  $\pm$  ESM; n=20). Grupo control (C), ayuno de 12 horas (T12), ayuno de 24 horas (T24) y ayuno de 36 horas (T36). \* Indican diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ), letras diferentes en un mismo tiempo indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0,05$ ).

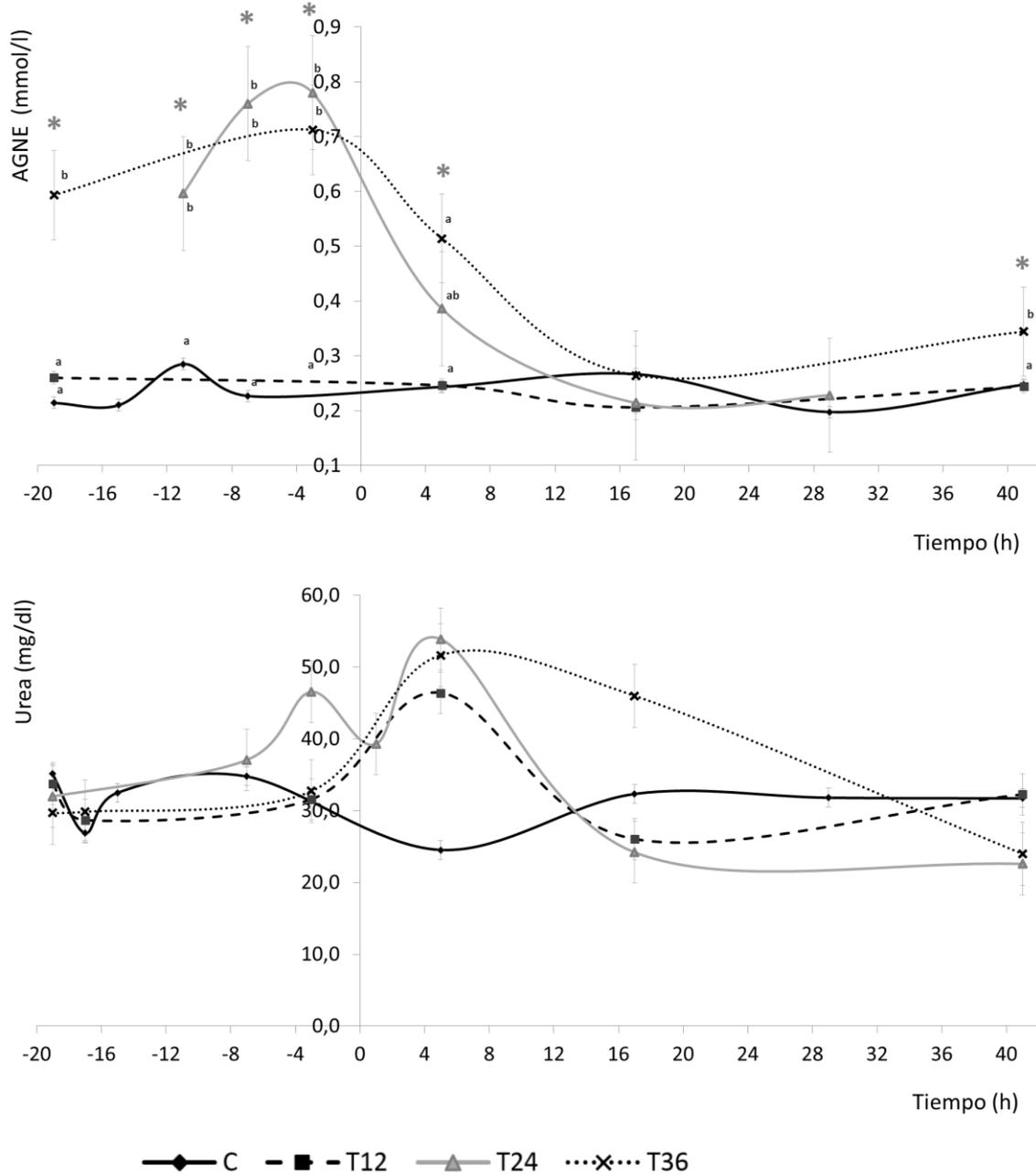
Durante la etapa posterior a la realimentación, los valores medios de glucosa en sangre fueron significativamente mayores que el control para los tratamientos

sometidos a ayuno (Figura 9), grupo control: 128,1 mg/dL, T12: 153,3 mg/dL, T24: 152,9 mg/dL y T36: 150,1 mg/dL. El efecto del tiempo y la interacción tratamiento x tiempo fueron significativos para esta variable ( $P \leq 0,05$ ). Los coeficientes de variación intraensayo para los controles bajos ( $88,6 \pm 5,15$  mg/dL) y altos ( $246,8 \pm 5,72$  mg/dL) fueron 1,6 % y 3,2 %, respectivamente.

Los niveles de insulina no se vieron afectados significativamente por el efecto del tratamiento ( $P=0,443$ ), sin embargo, sí existió efecto del tiempo e interacción tiempo x tratamiento ( $P \leq 0,05$ ). Las concentraciones en el grupo control fueron mayores en el período pre-ayuno (valores medios en Control: 36,2  $\mu$ UI/mL, T12: 29,6  $\mu$ UI/mL, T24: 20,0  $\mu$ UI/mL y T36: 18,0  $\mu$ UI/mL). Los tratamientos T12 y T24 presentaron picos de insulina luego de la realimentación. En T12 se registró una concentración máxima de 55,4  $\mu$ UI/mL al tiempo 5 h, mientras que T24 alcanzó una concentración de 51,1  $\mu$ UI/mL al tiempo 17 h (Figura 9). El coeficiente de variación intraensayo para el control 1 ( $19,0 \pm 1,02$   $\mu$ UI/mL) y el control 2 ( $81,53 \pm 3,23$   $\mu$ UI/mL) fueron 5,38 % y 3,96 % respectivamente.

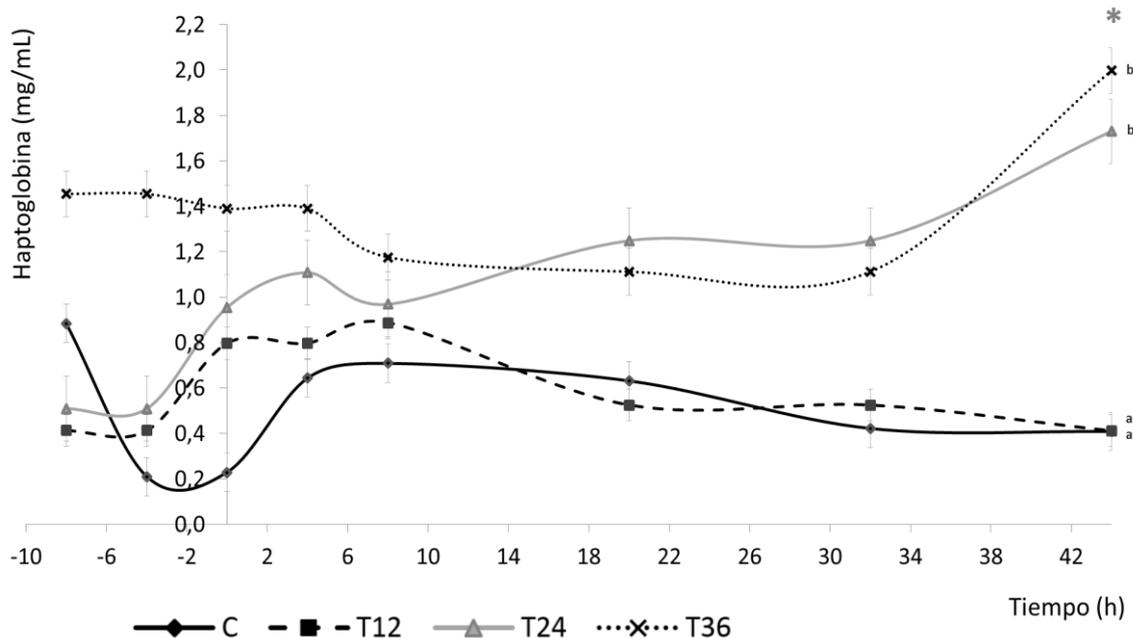
La concentración de AGNE fue afectada por el tratamiento ( $P \leq 0,05$ ), el tiempo ( $P \leq 0,05$ ) y hubo interacción tratamiento x tiempo ( $P \leq 0,05$ ). En T24 y T36 las concentraciones fueron máximas en las horas inmediatas previas a la realimentación (Figura 10). Los valores medios de AGNE en esta etapa fueron en grupo Control: 0,23 mmol/l, T12: 0,26 mmol/l, T24: 0,71 mmol/l y T36: 0,65 mmol/l. Esta diferencia se mantuvo durante el post-ayuno inmediato. El tratamiento T12 no presentó cambios en su concentración de AGNE mostrando siempre niveles similares al control. Al tiempo 41 h, la concentración de AGNE en T36 fue mayor que en el resto de los tratamientos ( $P \leq 0,05$ ), control: 0,248 mmol/l, T12: 0,244 mmol/l, T24: 0,247 mmol/l y en T36: 0,344 mmol/l. El coeficiente de variación intraensayo para el control 1 ( $1,05 \pm 0,03$  mmol/L) fue de 2,51 %.

La concentración de urea no fue afectada por el tratamiento ( $P=0,549$ ), por el tiempo ( $P=0,250$ ) y tampoco se encontró efecto de la interacción tratamiento x tiempo ( $P=0,251$ ) (Figura 9). Los valores medios de urea fueron en grupo Control: 31,2 mg/dL, T12: 44,7 mg/dL, T24: 36,4 mg/dL y T36: 35,6 mg/dL. Coeficientes de variación intraensayo para los controles bajos (34,2 mg/dL) y altos (148,1 mg/dL) fueron 3,8 % y 0,59 % respectivamente.



**Figura 10.** Concentraciones de AGNE (mmol/l) y Urea (mg/dl) en los animales en los distintos tratamientos, durante etapa pre-ayuno y realimentación (hora 0) (media  $\pm$  ESM; n=20). Grupo control (C), ayuno de 12 horas (T12), ayuno de 24 horas (T24) y ayuno de 36 horas (T36). \* Indican diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ), letras diferentes en un mismo tiempo indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0,05$ ).

## 10.4 EVOLUCIÓN DE HAPTOGLOBINA Y FUNCIONAL HEPÁTICO



**Figura 11.** Concentración de haptoglobina sérica (mg/mL) en los animales en los distintos tratamientos, durante etapa pre-ayuno y realimentación (hora 0) (media  $\pm$  ESM; n=20). Grupo control (C), ayuno de 12 horas (T12), ayuno de 24 horas (T24) y ayuno de 36 horas (T36). \* Indican diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ), letras diferentes en un mismo tiempo indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0,05$ ).

Existió efecto del tratamiento sobre la concentración de haptoglobina ( $P \leq 0,05$ ), sin embargo, no se registró efecto del tiempo ( $P = 0,480$ ) ni de la interacción tratamiento x tiempo ( $P = 0,109$ ). Durante el ayuno, la realimentación y el post-ayuno inmediato no se evidenciaron diferencias significativas en esta variable. Sin embargo, los animales del T24 y T36, presentaron concentración sérica de Hp significativamente mayor al tiempo 44 h luego de la realimentación, llegando a cuadruplicar el nivel registrado para el tratamiento control (Figura 11). Valores medios de haptoglobina en control: 0,41 mg/mL, T12: 0,41 mg/mL, T24: 1,73 mg/mL y en T36: 2,00 mg/mL. El coeficiente de variación intraensayo para el control 1 fue de 14,42 % y para el control 2 fue de 6,83 %. El coeficiente de variación interensayo para el control 1 ( $0,42 \pm 0,05$  mg/mL) fue de 12,79 % y para el control 2 ( $1,06 \pm 0,10$  mg/mL) fue de 9,41 mg/mL.

En la Figura 12 se presenta la dinámica de los principales parámetros evaluados en el funcional hepático. La concentración de albúmina fue afectada por el tratamiento ( $P = 0,033$ ), el tiempo ( $P < 0,0001$ ) y existió interacción tratamiento x tiempo ( $P = 0,045$ ). La concentración de albúmina en los tratamientos T12, T24 y T36 fue mayor durante

todo el período de muestreo, con valores medios de en T12: 3,55 g/dL, T24: 3,58 g/dL y en T36: 3,56 g/dL, mientras que el grupo control se situó en 3,43 g/dL. Al tiempo 41 h, el nivel de albúminas en T36 disminuyó de forma marcada llegando a concentraciones similares a las presentes en el grupo control, con niveles de 3,22 g/dL y 3,20 g/dL, respectivamente.

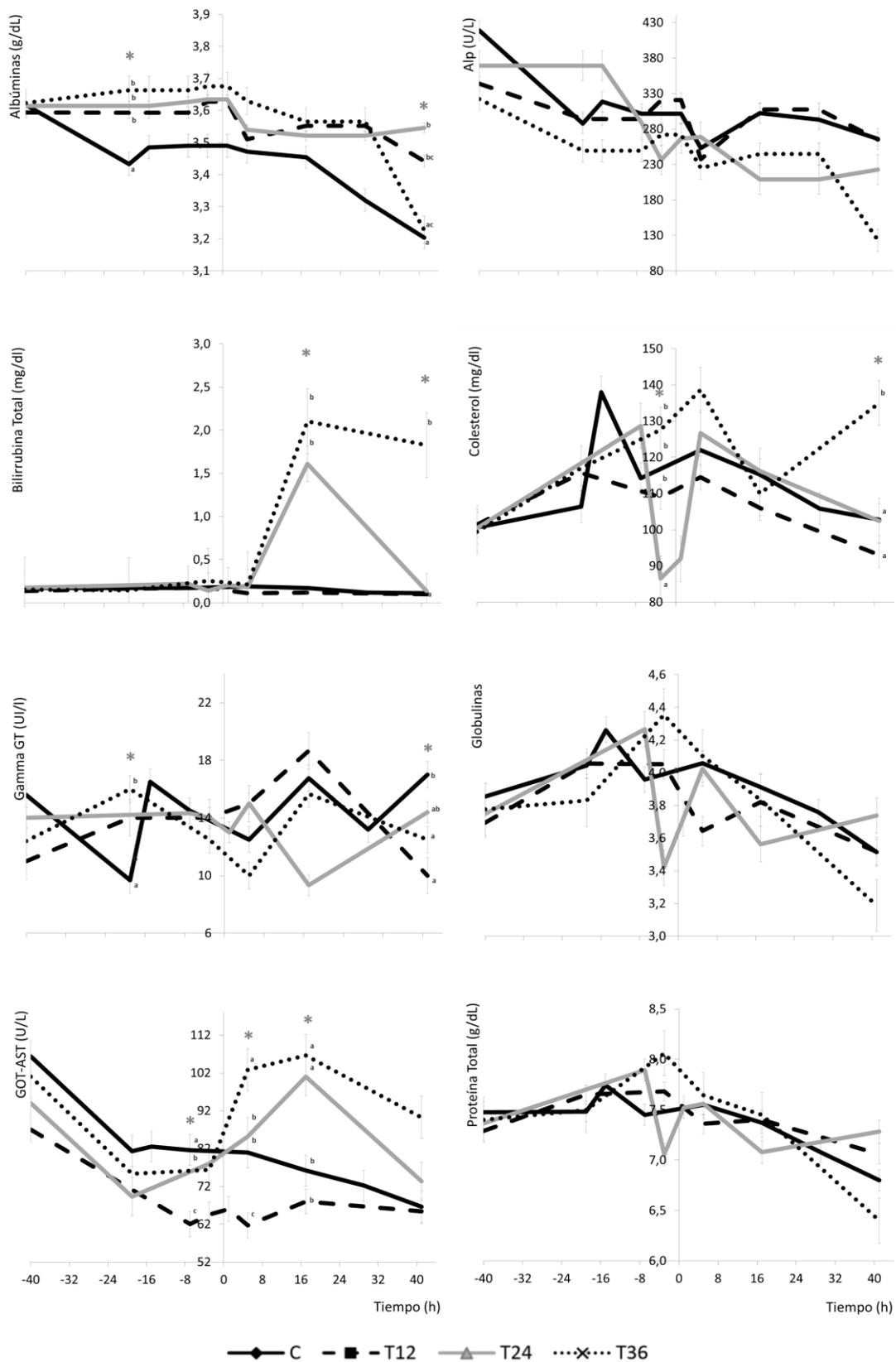
La concentración de ALP no fue modificada por el tratamiento ( $P=0,711$ ), ni existió interacción tratamiento x tiempo ( $P=0,224$ ), sólo se observó efecto del tiempo sobre esta variable ( $P<.0001$ ).

La variable bilirrubina total fue afectada de forma significativa por la aplicación de ayuno ( $P=0,031$ ), sin embargo, no se observó efecto del tiempo ( $P=0,864$ ) ni de la interacción entre ambos factores (tratamiento x tiempo;  $P=0,433$ ). Al tiempo 17 h en los tratamientos T24 y T36 se registraron marcados incrementos en el nivel de bilirrubina total llegando en T24 a 1,61 mg/dl y en T36 a 2,1 mg/dl, mientras que en el grupo control el nivel fue de 0,17 mg/dl sin existir diferencias entre este grupo y el T12. Las elevadas concentraciones se mantuvieron hasta el tiempo 40 h en T36 (valor medio de 1,83 mg/dl), en contraposición con lo ocurrido en T24 cuyos niveles de bilirrubina total descendieron llegando a valores similares a los registrados en el control (valor medio de T24:0,14 y grupo control: 0,11 mg/dl).

Con respecto a la concentración de colesterol y GGT sólo se registró un efecto de la interacción tratamiento x tiempo, ( $P=0,013$ ) y ( $P=0,003$ ) respectivamente. La concentración de colesterol durante todo el experimento en todos los tratamientos fue menor a 150,0 mg/dL. Durante la aplicación del tratamiento, al tiempo -3 h la concentración de colesterol en el grupo T24 (86,5mg/dL) fue más baja a la encontrada en el resto de los tratamientos que en promedio llegaron a 120 mg/dL. Trascorridas 40 h desde la realimentación la concentración de colesterol en T36 fue superior a la registrada en el resto de los tratamientos alcanzando 135,5mg/dL. Durante todo el experimento, la concentración de GGT observada en todos los tratamientos fue menor a 26,0 UI/I, los valores medios de GGT para el grupo control fue de 14,5 UI/I, mientras que para los tratamientos sometidos a ayuno los valores medios fueron de 13,5 UI/I. Durante el tiempo experimental -19 h, la concentración de GGT en el grupo control fue significativamente menor a la observada en el resto de los tratamientos (9,7 UI/I y 15,0 UI/I respectivamente). Analizando la etapa de realimentación, en el tiempo 40 h, se observó que el nivel en T12 y T36 fue menor que el registrado en grupo control y T24, (grupo control: 17,0; T12: 10,0; T24: 14,4 y en T36: 12,5 UI/I).

Se encontró efecto del tratamiento aplicado, tiempo e interacción tratamiento x tiempo ( $P=0,008$ ,  $P=0,05$  y  $P=0,043$ ; respectivamente) sobre la concentración de GOT-AST. El nivel de GOT-AST durante todas las fases del experimento fue superior a 52,2 U/L. Durante el ayuno la concentración de GOT-AST en el grupo control fue superior que la registrada en los grupos sometidos a ayuno (valores medios para grupo control: 87,9 U/L vs. T12: 71,2; T24: 80,4 U/L y T36: 84,2). Durante la realimentación el nivel de GOT-AST en T24 y T36 se incrementó, alcanzando al tiempo experimental 17 h concentraciones máximas cercanas a 107,0 U/L en T36 y 101,1 U/L en T24, al tiempo que los valores medios para los restantes grupos fueron muy inferiores, en el grupo control de 76,2 U/L y en T12 de 66 U/L.

No se observó efecto significativo del tratamiento aplicado, del tiempo ni de la interacción de ambos factores (tratamiento x tiempo) sobre el nivel de proteína total ( $P=0,466$ ,  $P=0,149$  y  $P=0,494$ ) ni sobre la concentración de globulinas ( $P=0,08$ ,  $P=0,622$  y  $P=0,224$ ).



**Figura 12.** Funcional hepático: concentración de Albúmina (g/dL), ALP (U/L), Bilirrubina total (mg/dl), Colesterol (mg/dl), GammaGT (UI/l), Globulinas, GOT (U/L) y Proteína total (g/dL) de los animales en los distintos tratamientos, durante etapa pre-ayuno y realimentación (hora 0) (media  $\pm$  ESM; n=20). Grupo control (C), ayuno de 12 horas (T12), ayuno de 24 horas (T24) y ayuno de 36 horas (T36). \* Indican diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ), letras diferentes en un mismo tiempo indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0,05$ ).

## 11. DISCUSIÓN

La aplicación de distintas horas de ayuno afectó el comportamiento de los animales durante la realimentación. Todos los novillos sometidos a ayuno manifestaron un comportamiento marcadamente ingestivo, con una mayor frecuencia de ingestión del alimento comparado con el grupo control. Entre los tratamientos de ayuno no se encontraron diferencias en cuanto a este parámetro. Durante la realimentación estos animales adecuaron su comportamiento posiblemente como una forma de compensar la restricción a la que fueron expuestos. En experimentos previos realizados en condiciones de pastoreo con restricciones en el tiempo de acceso a las pasturas, tanto en vacas lecheras (Mattiauda et al. 2004; Pérez-Ramírez et al. 2008; Kennedy et al. 2009; Pérez-Ramírez et al. 2009), en ganado para carne (Soca et al. 2002; Gekara et al. 2005; Félix, 2012) y en pequeños rumiantes (Iason et al. 1999; Berhan et al. 2005; Pérez-Ruchel et al. 2009; Pérez-Ruchel et al. 2013), se ha evidenciado esta habilidad de los rumiantes para concentrar la actividad de ingestión durante las horas de disponibilidad de alimento. En animales lecheros se ha visto que en las primeras horas de cada sesión de alimentación se produce un aumento de la proporción del tiempo destinado a la ingestión en detrimento de actividades como la rumia y el descanso (Gregorini et al. 2009). En este trabajo, también se registró una disminución en la frecuencia de la rumia que mostró valores inferiores en los animales de los tratamientos con ayuno. La mínima frecuencia de rumia se observó en los animales del T36. A su vez, los animales en los tratamientos T12 y T36 mostraron disminuciones en la frecuencia de consumo de agua mientras que en T24 el comportamiento fue similar al de los animales del grupo control. Resultados comparables se reportaron en un trabajo realizado en vaquillonas de engorde donde fue evaluado el efecto del incremento de retraso en la entrega diaria de alimentos (1, 2 o 3 horas). En este caso, se observó que la cantidad de agua ingerida (L/kg de MS consumida) disminuyó inversamente con el retraso de la distribución del alimento (González, et al. 2009).

El efecto de la frecuencia de alimentación sobre el comportamiento ingestivo ha sido estudiado en vacas lecheras en etapa de lactación (Phillips y Rind, 2001; DeVries et al. 2005), pero no hay información en bovinos para carne consumiendo dietas altas en concentrados energéticos. A diferencia de lo encontrado en el presente trabajo, en vacas Holstein sometidas a frecuencias variables de administración de alimento (una, dos, tres o cuatro veces al día) no existió efecto sobre el tiempo diario destinado a comer, rumiar o beber (Robles et al. 2007).

Normalmente los bovinos consumen los concentrados alrededor de 4 a 12 veces más rápido que los forrajes lo que hace que el grado de insalivación sea tres veces menor, el nivel de insalivación durante el consumo de forrajes es de 3,40 a 7,23 g de saliva/g de MS, mientras que durante el consumo de concentrados es de 1,12 g de saliva/g de MS (Beauchemin, 1991; Beauchemin et al. 2008). Por lo tanto, la tasa de salivación es afectada por la velocidad de ingestión del alimento, los bovinos comúnmente aumentan la tasa de ingestión a través de una disminución en la eficiencia de masticación lo que repercute negativamente en el aporte de saliva. La ingestión de grandes cantidades de alimento con altas tasas de ingestión, con poco tiempo dedicado a la masticación y menor grado de insalivación son características asociadas con un bajo pH del fluido ruminal (González et al. 2012). Otro punto relevante es el tiempo destinado a la rumia, ya que la disminución de esta actividad hace descender el flujo de saliva hacia el retículo-rumen (Church, 1988; Garrett, 1996). Se ha visto que el comportamiento ingestivo y el pH del rumen están estrechamente relacionados (Giger-Reverdin et al. 2011). En el presente experimento, es posible hipotetizar que los animales del T36 tuvieron un aporte de saliva bajo ya que presentaron altas tasa de consumo de concentrados, con elevado ritmo de ingesta y con baja actividad de rumia.

En vacas lecheras se ha visto que una lenta tasa de alimentación y un mayor tiempo dedicado a la ingesta de alimento ayudan a prevenir la acidosis ruminal por medio del aumento de la secreción salival diaria (Beauchemin, et al. 2008). El tiempo de masticación ha sido sugerido como un buen indicador de la salud ruminal, teniendo en cuenta que la rumia estimula la secreción salival causando neutralización de los ácidos producidos a partir de la fermentación (Allen, 1997). Los programas de alimentación que presentan restricciones en la cantidad y tiempo disponible de alimentación, hacen que los animales experimenten períodos de apetito. Estas situaciones determinan que, una vez que los animales logran acceder a la comida, el volumen y el ritmo de ingestión sea mayor produciendo alto riesgo de acidosis (González et al. 2012).

En el análisis de correspondencia llevado a cabo en este trabajo, se vincularon las actividades del comportamiento ingestivo y los tratamientos de ayuno aplicados. Mediante este análisis se pudo constatar que el tratamiento T36 estuvo claramente asociado al consumo de alimento y no al resto de las actividades.

Las diferencias significativas en el tiempo dedicado al consumo de alimento y a la rumia observadas entre tratamientos, concuerda con los resultados obtenidos en el análisis del ritmo de ingestión de la ración. Si bien al ofrecer el alimento todos los novillos tuvieron un ritmo de consumo similar, pasadas las dos horas desde la realimentación los animales del tratamiento control, perdieron el interés en ingerir el

alimento por lo tanto el ritmo de ingestión disminuyó. En cambio, los animales de los tratamientos T12, T24 y T36 manifestaron un ritmo de ingestión superior que el tratamiento control, manteniendo el nivel de ingesta hasta lograr vaciar el comedero a las cinco horas de la realimentación. Comparando el mismo tiempo experimental, en los comederos del grupo control aún existía un remanente de alimento sin consumir. Esta adaptación en la ingestión de alimento, pudo basarse en un incremento en el tamaño de cada bocado o en un aumento de la tasa de bocado, parámetros que no fueron determinados en este experimento. Los resultados aquí presentados están en contraposición a reportes previos donde la fluctuación en la distribución del alimento no determinó modificaciones en la duración de la alimentación ni en el número de veces que los animales se acercaron al comedero (Schwartzkopf-Genswein et al. 2004).

La definición de los distintos tipos de acidosis en la literatura es inconsistente ya que los diferentes autores proponen diversos puntos de corte de pH ruminal diferentes para clasificar las formas clínica y subclínica de la enfermedad (Khafipour et al. 2009a). Se ha comprobado que animales con alto consumo de granos y concentrados energéticos presentan un pH ruminal con media diaria dentro de un rango de 5,8 a 6,5 (Nagaraja y Titgemeyer, 2007). En el presente trabajo, los animales del grupo control, que estaban adaptados al consumo de concentrados energéticos (85% de la dieta) tuvieron un patrón de pH con medias diarias de 5,8, valor dentro del rango de SARA. Sin embargo, los animales presentaron patrones de recuperación rápida a lo largo del día. El pH ruminal fue afectado por el ayuno, así como por la severidad del mismo. Durante la etapa de ayuno, el pH ruminal aumentó gradualmente hasta los niveles máximos próximo al momento de la realimentación (hora 0) coincidente con el ayuno máximo para cada tratamiento. Lo anterior ha sido comprobado en otros experimentos donde se observó que la restricción al alimento por 24 horas determinó un incremento gradual del pH ruminal (DeVries et al. 2009). Al momento de la realimentación los animales en los tratamientos que fueron sometidos a ayuno alcanzaron valores de pH alcalinos, observación que concuerda con otros trabajos realizados en ganado para carne en ayuno (Meiske et al. 1958; Rumsey, 1978; Cole y Hutcheson, 1979; Galyean, et al. 1981). Por ejemplo, Galyean et al. (1981) reportaron valores de pH ruminal de hasta 7,67 en novillos sometidos a ayuno durante 32 h. Estos valores altos del pH ruminal también han sido observados en momentos alejados de las comidas en animales sin ayuno prolongado (Bacha et al. 2005). En el mismo sentido, se ha reportado que la distribución irregular de alimento produce descensos en el consumo, lo que se asoció con aumento del pH ruminal debido a menor cantidad de sustrato disponible en el rumen para la fermentación (Schwartzkopf-Genswein et al. 2004).

Inmediatamente luego de la realimentación el pH ruminal disminuyó rápidamente, con caídas pronunciadas en los animales de los tratamientos sometidos a ayuno. Al tiempo experimental 12 h se registraron los valores mínimos de pH ruminal en T12: 4,9, T24: 5,2 y T36: 4,5. Esta rápida caída del pH durante la realimentación en animales previamente sometidos a ayuno ha sido reportada anteriormente (Rumsey, 1978; Cole y Hutcheson, 1979). Se puede estimar que el ingreso de alimento al rumen permitió la reactivación de la actividad fermentativa, lo que condujo a estos descensos de pH ruminal. Los animales sometidos a ayunos de 12 y 24 horas (T12 y T24) sufrieron caídas de pH compatibles con las registradas en episodios de SARA (Gozho et al. 2005), mientras que T36 llegó a valores menores de 5,0, pH ruminal propuesto para el diagnóstico de acidosis aguda (Garrett et al. 1999; Beauchemin et al. 2003; Nagaraja y Titgemeyer, 2007). Los animales presentaron la condición ruminal propuesta para la identificación de SARA, consistente en valores de pH ruminal menor a 5,6 por un período mayor a 3 horas (Gozho et al. 2005; Gozho et al. 2007). Los valores reducidos de pH ruminal que se registraron en animales de T12, T24 y T36, permanecieron bajos durante 28 horas, 10 horas y 24 horas respectivamente. En el caso de animales del T36 se registraron valores aún inferiores a pH 5,0 durante casi 10 horas. La rápida disminución de pH ruminal durante el período de restablecimiento de la alimentación en novillos previamente sometidos a ayuno se ha informado anteriormente (Cole y Hutcheson, 1979; Galyean, et al. 1981). Sin embargo, el descenso registrado en estos casos no fue tan pronunciado como los valores encontrados en el presente trabajo, llegando sólo a niveles próximos a 6,18 (Galyean, et al. 1981).

Las modificaciones en el pH ruminal observadas en los animales del tratamiento T36 concuerda con el marcado patrón de ingesta expresado en este grupo durante la realimentación. Esto ocasionó que gran cantidad de alimento llegara rápidamente al rumen, sumado a la baja frecuencia de rumia presente en este grupo pudo posiblemente condicionar la insalivación del alimento, limitando el volumen de saliva que ingresó al rumen, ambos aspectos pudieron favorecer los niveles de pH ruminal bajos. En un trabajo previo, se observó que, en novillos alimentados con una dieta alta en concentrado energético, y sometidos a variaciones del 10% del alimento ofrecido resultó en aumentos de 20 a 30% en la tasa de ingestión asociado a incrementos del tiempo durante el cual el pH se encontró por debajo de 5,6 (Cooper et al. 1999).

A partir del tiempo 70 h post realimentación todos los tratamientos presentaron similares valores del pH ruminal y no existieron diferencias significativas entre ellos. A pesar de las variaciones extremas de pH que causó el ayuno, a partir de ese momento (70 h) todos los animales lograron recuperar dinámicas de pH ruminal similares a las registradas en el grupo control. En una revisión de experimentos de

inducción de SARA en vacas lecheras, donde se realizó el seguimiento de los animales durante las primeras 48 horas posteriores al desafío, se vio que, si bien el pH ruminal durante la etapa inmediata de recuperación no retornó a los valores registrados antes del desafío, sí fue posible constatar una tendencia a la recuperación (Krause y Oetzel, 2005). En otros reportes de acidosis inducida empleando carbohidratos fácilmente fermentescibles en ovejas de 2,5 a 3 años, novillos cruza de 320 kg y en cabras de 15 a 25 kg de PV, se comprobó que fueron requeridas más de 100 h de recuperación para retornar a los valores iniciales de pH ruminal (Patra et al, 1996; Nour et al. 1998; Brown et al, 2000). En estos experimentos se alcanzaron valores mínimos de pH ruminal en torno a 4,7 los cuales retornaron a valores normales de alrededor de 6,5 luego de transcurridas entre 120 y 144 h (Patra et al. 1996, Nour et al. 1998, Brown et al, 2000).

Existió un efecto significativo del ayuno, el tiempo y de la interacción entre tratamiento x tiempo sobre la concentración de AGV totales. Normalmente la concentración de AGV totales en rumen oscila entre valores de 30 a 200 mM (France y Dijkstra, 2005; Kozloski, 2011). Los niveles de AGV totales obtenidos en todos los tratamientos del presente trabajo variaron dentro de estos márgenes, excepto durante la fase correspondiente a las últimas horas de ayuno en T12, T24 y T36. Durante esta etapa la concentración de AGV totales en el grupo control fue superior a la registrada en los tratamientos sometidos a ayuno, observación concordante con la disminución de la tasa de fermentación (Cole y Hutcheson 1981). Efectivamente, frente a un ayuno de 48 h se ha visto que tiene lugar una reducción del 75 % de la capacidad fermentativa ruminal, la cual continúa disminuyendo hasta por cinco días luego de finalizada la restricción (Cole y Hutcheson 1981). En el mismo sentido y con respecto a la concentración de AGV totales en animales sometidos a ayuno el nivel de AGV totales puede llegar a ser 5 veces menor que el encontrado en animales no restringidos en la alimentación (Cole y Hutcheson 1979; Galyean, et al. 1981).

Inmediato a la realimentación, la concentración de los AGV totales de todos los animales en los tratamientos sometidos a ayuno se incrementó. Esta observación condice con lo reportado en estudios previos donde la realimentación indujo rápidos incrementos de la concentración de AGV así como su acumulación (Owens et al. 1998; Coe et al. 1999; Khafipour et al. 2009b; Golder et al. 2012; Sato, 2016). En esta etapa los animales de T24 y T36 tuvieron niveles más bajos de AGV totales en comparación con el grupo control y T12. A pesar de este aumento inicial en la concentración de AGV totales en las primeras horas posteriores al restablecimiento de la alimentación, el nivel de AGV totales dejó de incrementarse posiblemente por el efecto de la rápida absorción de los mismos. Es posible estimar que el descenso de pH ruminal registrado en T12, T24 y T36 inmediato posterior a la realimentación pudo atribuirse en una primera instancia a la acumulación de AGV. En condiciones

de pastoreo, la restricción en el tiempo de acceso al alimento, frecuentemente, induce en forma compensatoria, a pastoreos intensos de grandes cantidades de forraje lo que da como resultado un aumento significativo de la concentración ruminal de AGV y una disminución del pH ruminal los cuales podrían afectar negativamente la actividad de la microbiota ruminal y en consecuencia alterar la fermentación ruminal (Cajarville et al. 2006).

Varios autores han relacionado la disminución de pH ruminal, producida a partir de la ingesta, con el aumento de la concentración de AGV en el rumen (Marshall et al. 1992; Goad et al. 1998; Voelker y Allen, 2003). Si bien en el presente trabajo la concentración de AGV totales en los animales que habían sufrido ayuno se incrementó en la realimentación, este aumento se detuvo al tiempo experimental 4 h posiblemente debido a su absorción. Por tal motivo es posible especular que las diferencias de pH halladas entre tratamientos en esta etapa no se deben a diferencias en la concentración de AGV totales. Teniendo en cuenta que la reducción del pH ruminal se debe comúnmente a la acumulación de AGV o de ácido láctico (Plaizier et al. 2009; Dijkstra et al. 2012), se puede interpretar que en el presente trabajo el ácido láctico contribuyó de manera importante en la reducción del pH en rumen. Hallazgos similares se obtuvieron en experimentos con dietas con diferente densidad energética donde cambios significativos en el pH ruminal no pudieron ser explicados por alteraciones en el nivel de AGV totales (Rabelo et al. 2003). En la misma línea, los resultados obtenidos durante desafíos de SARA empleando grano o pellets de alfalfa en vacas lecheras no pudieron ser explicados por cambios en la concentración de AGV totales (Li et al. 2012). Se ha reportado que, si bien al comienzo de la acidosis generalmente la concentración de AGV total se incrementa, a medida que progresa la enfermedad la concentración puede disminuir drásticamente debido a, la depleción de la microbiota ruminal normal y/o al efecto de dilución causado por la afluencia de líquidos con el objetivo de compensar el aumento de la osmolalidad ruminal (Huber, 1976). Otra posible explicación a este fenómeno puede ser atribuido a un mal funcionamiento del sistema buffer, el cual pudo verse distorsionado por el efecto del ayuno y la escasa insalivación por consumo acelerado. Esto pudo ocasionar el marcado descenso de pH ruminal, a pesar de que el nivel de AGV no fue tan elevado como el registrado en el tratamiento control. Es importante destacar que factores que influyen sobre el pH ruminal, como el consumo de agua y el grado de salivación, no fueron cuantificados en el presente experimento.

La concentración de AGV está dada fundamentalmente por su nivel de producción y su velocidad de absorción. Normalmente los niveles máximos de producción de AGV se registran durante las primeras dos horas posteriores a la alimentación, permaneciendo elevados durante 4 a 6 horas (Stewart, et al. 1958). Se ha evidenciado que la producción de AGV está influenciada por factores como la composición y

disponibilidad de sustrato como así también por las especies microbianas presentes en rumen (Dijkstra, 1994). Frente a valores de pH ruminal bajo los ácidos están en mayor proporción bajo su forma no disociada lo que hace aumentar la velocidad de absorción de AGV a través de la pared ruminal (Dijkstra et al. 1993; Oetzel, 2001). En este trabajo, todos los animales de los tratamientos sometidos a ayuno presentaron un descenso del pH ruminal por debajo del umbral registrado para animales adaptados al consumo de granos (5,8-6,5) (Nagaraja y Titgemeyer, 2007). Los animales de los tratamientos T12, T24 y T36 presentaron un pH ruminal más cercano al pKa de los principales AGV (pKa aproximado 4,8) en comparación al pKa del ácido láctico (pKa 3,9). Esta situación permite hipotetizar que bajo estas condiciones, la absorción de AGV se incrementó teniendo en cuenta que pudo existir mayor proporción de AGV en su forma no disociada lo que elevaría su tasa de absorción a través del epitelio ruminal (Bergman, 1990). El ácido láctico al tener un pKa menor, posiblemente se encontró en menor proporción en la forma protonada en comparación con los AGV, lo que llevó a que se acumulara en el rumen (Oetzel, 2001). Valorando todos los puntos mencionados, es posible pensar que una vez restablecida la llegada de alimento pudo tener lugar una producción y absorción inmediata de los AGV. La realimentación determinó una fuente de energía disponible para la microbiota bacteriana ruminal que posiblemente permitió la activación de los procesos fermentativos. Teniendo en cuenta que el período de menor pH ruminal en todos los tratamientos fue durante las primeras 12 h desde la realimentación se puede pensar que durante este tiempo la absorción de los AGV fue muy importante. Se puede interpretar que la marcada absorción de AGV no permitió reflejar la alta producción de los mismos por tratarse de procesos ocurridos al mismo tiempo. En este punto debe tenerse en cuenta que no se determinó la producción de AGV, sino que se cuantificó la concentración instantánea de ácidos en líquido ruminal, lo que podría limitar de alguna manera la interpretación de los resultados.

Normalmente a nivel ruminal el ácido láctico está en concentraciones menores a 10 mM (Ghorbani et al. 2002). En el presente experimento se registró un efecto significativo del ayuno sobre el nivel de ácido láctico. Al evaluar la concentración de este ácido, se observó que a las 4 h luego de la realimentación la concentración se incrementó en los tratamientos sometidos a ayuno, alcanzando un máximo a las 8 h. Estas variaciones observadas fueron mayores en los animales de los tratamientos T24 y T36. La acumulación de ácido láctico coincidió con la caída abrupta del pH ruminal y fue similar a lo reportado en un trabajo en vacas lecheras donde los animales no mostraron signos clínicos de acidosis ruminal (Golder et al. 2012). En el mismo trabajo se observó que concentraciones de D-lactato próximas a 16,42 mM y de L-lactato de 6,41 mM no provocaron signos clínicos de SARA o acidosis lo que llevó a la interpretación de que la concentración de ácido láctico en rumen no sería la principal determinante de la expresión clínica de acidosis (Golder et al. 2012).

Cuando se mantiene el pH ruminal superior a 5,5 – 5,7, existe un equilibrio entre los microorganismos productores y utilizadores de ácido láctico, de manera tal que este ácido no se acumula (Nocek et al. 1997). Generalmente durante SARA la concentración de ácido láctico permanece baja hasta que el pH ruminal desciende más allá de 5,7, momento en el cual empieza su acumulación (Dijkstra et al. 2012). En el presente trabajo, el pH de los animales en los tratamientos T12, T24 y T36 estuvo por debajo del umbral de pH 5,7 al tiempo 4 a 6 h de la realimentación momento en el cual comenzó a acumularse el ácido láctico en rumen.

Períodos de pH ruminal muy alto, como los obtenidos durante las restricciones de alimento, conducen a una alteración en el equilibrio microbiano ya que un pH ruminal elevado puede inhibir las tasas de crecimiento de poblaciones bacterianas utilizadoras del ácido láctico las cuales son sensibles a pH alcalino (Mackie y Gilchrist, 1979; Krause y Oetzel, 2006). Por lo tanto, bajo estas circunstancias la comunidad bacteriana no será la adecuada para hacer frente a una posible concentración elevada de ácido láctico durante la realimentación. Normalmente cuando no existen restricciones de alimento, los bovinos consumen entre 10 a 12 comidas por día, lo que mantiene las condiciones ruminales estables y permite el adecuado crecimiento de los microorganismos (Forbes, 2007). *Megasphaera elsdenii* representa el 20 % de los microorganismos consumidores de ácido láctico en animales alimentados con dietas ricas en concentrados energéticos (Mackie et al. 1984), y utiliza cerca del 60 a 80% del ácido producido (Counotte et al. 1981). Su tasa de crecimiento es baja frente a pH ruminal de 6 a 5,5, y además se ha comprobado que, frente al ayuno, *Megasphaera elsdenii* tiene una resistencia reducida, con capacidad de supervivencia de sólo el 50% frente a un desafío de inanición (Mink et al. 1981). Por otro lado, frente a episodios de ayuno la vida media de *Selenomonas ruminantium* es de sólo 2,5 horas (Lundin et al. 1975; Mink et al. 1981; Russell et al. 1997). De forma contraria, uno de los principales microorganismos productores de ácido láctico como es *S. bovis*, presenta mayor resistencia a episodios de ayuno que la mayoría de los microorganismos ruminales, por lo tanto, frente a períodos de inanición aumenta su número relativo (Muir et al. 1977). En esas condiciones es esperable que microorganismos como *S. bovis* dirijan el metabolismo de los carbohidratos hacia la producción de ácido láctico en lugar de formar AGV, la producción de ácido láctico promueve su propia acumulación al contribuir en el mayor descenso del pH (Oetzel, 2001). La disminución de la fermentación del ácido láctico es atribuida a la caída del pH ruminal por debajo del rango necesario para que las bacterias fermentadoras de ácido láctico estén activas (Therion et al. 1982). Por esta razón se postula que el desarrollo de acidosis se debe en mayor parte a la no metabolización del ácido láctico más que al efecto del incremento de su síntesis (Calsamiglia, 1997).

Si bien la concentración propuesta para identificar acidosis aguda grave es 40 mM (Owens et al. 1998), el nivel alcanzado en T24 y T36 fue mayor a este valor sin existir manifestación clínica de la patología. Si bien la concentración de este ácido descendió rápidamente, en T24 se produjo una caída más lenta, permaneciendo con concentraciones elevadas por más horas. En T36 se registró un segundo incremento de ácido láctico en el tiempo 24 h.

Durante la fase de ayuno y a medida que las horas de restricción se acumularon hasta hacerse máximas en cada tratamiento, la relación ácido acético/propiónico se fue incrementando a favor del ácido acético. Una vez que los animales fueron realimentados esta relación disminuyó rápidamente en T12, T24 y T36. En estudios previos se evidenció que la incorporación de concentrados almidonosos a una dieta de base forrajera causa una disminución relativa del ácido acético a favor de un incremento relativo del ácido propiónico (Aguerre et al. 2013a). De forma similar, se puede estimar que una respuesta semejante pudo darse en las condiciones del presente experimento, donde la llegada de alimento rico en concentrados luego del ayuno produjo una reducción relativa del ácido acético a favor de un incremento del propiónico. En una inducción de SARA mediante el desafío con pellets de alfalfa se evidenció un descenso en la relación ácido acético/ácido propiónico (A/P) desde 2,62 a 1,73 (Khafipour et al., 2009b). Se ha visto que una frecuencia diaria de alimentación alta (dos vs. seis comidas) permite obtener relaciones de ácido A/P más elevadas (3,6 – 3,0) vs (2,8 – 2,2) (Kaufmann et al. 1980). La reducción significativa en la relación A/P resultante del desafío de SARA ha sido reportada con anterioridad (Sauvant y Mertens, 1998; Gozho et al. 2007; Khafipour et al. 2009b; Castrillo et al. 2013).

Varios trabajos han reportaron que la concentración limitante de N-NH<sub>3</sub> necesaria para la actividad de los microorganismos ruminales se encuentra en torno a 2,0 – 6,0 mg/dL (Bryant y Robinson, 1961; Satter y Slyter, 1974; Clark et al. 1992; van Soest et al. 1994). Los niveles medios de N-NH<sub>3</sub> en rumen y su dinámica, sugieren que el nitrógeno no fue un factor limitante para el crecimiento microbiano en ninguno de los tratamientos del presente trabajo. Existió efecto de la aplicación de ayuno, del momento en que se realizó el muestreo y de la interacción entre estos factores (tratamiento x tiempo) sobre el nivel de N-NH<sub>3</sub> en el líquido ruminal. En la etapa de ayuno todos los tratamientos presentaron concentraciones similares a excepción de T24 que tuvo niveles más elevados en este período. A pesar de que era de esperar que una mayor provisión de energía fácilmente fermentable en rumen, lograda durante la realimentación generase una menor concentración de N-NH<sub>3</sub> ruminal debido a un mejor aprovechamiento del N por los microorganismos, esto no fue observado en este experimento. En el tiempo 4 h posterior a la realimentación se registró un pico máximo de la concentración de N-NH<sub>3</sub> en T12, T24 y T36, que

descendió rápidamente a excepción del T24 donde permaneció elevado incluso a las 24 h. Se ha reportado que el suministro de alimentos dividido en más fracciones diarias permite menores fluctuaciones de las concentraciones postprandiales de N-NH<sub>3</sub> (Aronen, 1991; Soto-Navarro et al. 2000; Robles et al. 2007). Teniendo en cuenta que niveles de pH ruminales altos determinan mayor proporción de N-NH<sub>3</sub> en su forma disociada y por tanto una mayor absorción de este elemento en rumen, se podría pensar que los descensos abruptos de pH registrados limitaron su absorción, tal como describió Kozloski (2011).

Se produjeron cambios endócrinos en los niveles de glucosa, insulina y AGNE. Se observó un efecto del tratamiento, del momento del muestreo y la interacción entre ambos factores sobre el nivel de glucosa y AGNE, mientras que sobre la concentración de insulina existió un efecto de la hora de muestreo y la interacción tratamiento x tiempo.

La glicemia en los rumiantes es consecuencia de la neoglucogénesis hepática que en condiciones como las de este experimento, el animal utiliza como sustrato fundamentalmente el ácido propiónico y ácido láctico producido a nivel ruminal, aunque adicionalmente, en dietas ricas en almidón la llegada del mismo al intestino delgado puede contribuir a la absorción de glucosa post ruminal. Los valores de referencia de glucosa para bovinos se encuentran entre 44,6 – 84,2 mg/dL (Kaneko et al. 2008). En este experimento las concentraciones fueron muy superiores a este rango. El nivel de glucosa se incrementó en T24 y T36 de forma marcada luego de la realimentación, mientras que en T12 la concentración de glucosa no tuvo diferencias con el tratamiento control. La insulinemia de los tratamientos T12, T24 y T36 fue mayor luego de la realimentación en comparación con el grupo control, reflejando así una mayor necesidad de secreción insulínica para mantener la glicemia, lo que era esperado teniendo en cuenta que la insulina en sangre esta positivamente correlacionada con el consumo (Chilliard et al. 1998). La insulina actúa como el principal impulsor de la entrada de glucosa a nivel celular, por lo tanto, mayores niveles de glicemia estimulan la secreción de insulina en sangre (Coffee, 1998; O'Brien et al. 2008). En el presente trabajo, el incremento del nivel de insulina coincidente con el momento de la realimentación reafirma que los niveles de insulina están asociados a un mayor consumo y nivel de energía por parte de los animales o a una mayor absorción de ácido propiónico a nivel ruminal y de glucosa a nivel intestinal, elementos que promueven la secreción de esta hormona (Harmon, 1992). Las dietas que estimulan una alta degradación de almidón y formación de ácido propiónico en el rumen tienen asociado mayores niveles de insulina en sangre (Harmon, 1992). Los cambios registrados en los niveles medios de insulina en sangre para T24 y T36 son coherentes con las variaciones en los valores de glucosa. Se ha visto que las mayores concentraciones en sangre de glucosa e insulina durante SARA

y acidosis pueden ser explicados por un aumento de la producción y la absorción de ácido propiónico en el rumen, así como su conversión en glucosa en el hígado a través del proceso de gluconeogénesis hepática (Reynolds, 2006).

El nivel de AGNE ha sido sugerido como un buen indicador del balance energético negativo en vacas lecheras, y sugiere mecanismos de compensación para proporcionar energía a través de procesos de lipólisis cuando no se encuentran disponibles otras fuentes de glucosa (Lucy, 2003; Iqbal et al. 2012). En este experimento, T24 y T36 presentaron niveles máximos de AGNE en el momento de mayor cantidad de horas de ayuno, justo antes de la realimentación. El descenso de glucosa y el incremento de AGNE en plasma en esta etapa son reflejo de un estado de déficit energético debido a la caída de AGV como consecuencia de la interrupción del consumo de alimento. Este punto claramente sugiere que existió un déficit en el balance energético en los animales sometidos a ayuno prolongado. Se ha observado que durante los períodos en que la glucosa y la insulina se encuentran disminuidas en el plasma, los AGNE se movilizan para mantener la homeostasis de la energía mediante la lipólisis en el tejido adiposo (Webb et al, 1969; Van Harmelen et al. 1999). Sin embargo, el T12 no evidenció niveles circulantes de AGNE diferentes al grupo control, lo que permite interpretar que el ayuno de 12 horas no desencadenó un movimiento de las reservas lipídicas. El perfil de descenso de AGNE luego de la realimentación y el aumento de glucosa e insulina en sangre denota una potente señal antilipolítica (Wheelock et al. 2010) característicos de balance energético favorable.

Los valores de urea en plasma de los animales en los tratamientos control, T24 y T36 se encontraron dentro de los rangos normales para bovinos (15,5 – 41,9 mg/dL) (Kaneko et al. 2008). Los animales sometidos a tratamientos con ayuno prolongado posiblemente sufrieron una movilización de sus reservas lipídicas, no así de sus reservas de proteínas ya que el nivel de urea en sangre no fue afectado por el tratamiento, ni por el tiempo ni existió interacción del tratamiento x tiempo. Estos resultados no están en concordancia con otros reportes, en los que se comprobó que en animales cursando acidosis se produjo incrementos de urea plasmática a través del incremento del catabolismo de tejidos musculares para la obtención de aminoácidos para la neoglucogenesis hepática (Patra et al. 1996; Hess et al. 2005; Dann et al. 2005; Hammond, 2006).

Durante todo el período de análisis y en todos los animales, las concentraciones de haptoglobina se ubicaron por encima de 110 µg/mL. Este valor es considerado como umbral mínimo inflamatorio para el ganado de carne (Tourlomoussis et al. 2004), describiendo de esta manera un patrón sérico compatible con una respuesta de tipo inflamatoria. La alimentación en base a dietas ricas en concentrados de rápida fermentación provoca descensos del pH ruminal, cambios en la microbiota y

acumulación de endotoxinas lo que induce una respuesta inflamatoria inespecífica que incrementa rápidamente el nivel de Hp a las tres semanas de iniciado el suministro (Jafari et al. 2006; Emmanuel et al. 2008; Ametaj et al. 2009). A pesar del alto nivel de Hp registrado en todos los tratamientos, atribuido al tipo de alimentación recibida y asociada potencialmente a la presencia de la cánula ruminal, los animales sometidos a ayuno presentaron concentración sérica de Hp significativamente mayor ( $P \leq 0.05$ ). En T36 y T24, ambos con ayunos prolongados, la concentración sérica de Hp fue más elevada en todo el período, llegando a cuadruplicar el nivel registrado para el grupo control a las 44 horas de finalizado el ayuno ( $P=0,03$ ). Durante episodios de SARA se produce inflamación, procesos degenerativos de papilas ruminales, ruminitis, hiperqueratosis y paraqueratosis volviendo al epitelio ruminal susceptible a injurias que facilitan la translocación de endotoxinas (Kleen et al. 2003). Las endotoxinas como componentes celulares de bacterias Gram-negativas (LPS) actúan como inductores de respuesta inflamatoria aguda del sistema inmune inespecífico. El perfil de biosíntesis hepático se modifica produciendo proteínas de fase aguda como la Hp que es liberada por los hepatocitos para reducir la hemoglobina plasmática libre y evitar así que el hierro quede a disposición para el crecimiento y multiplicación bacteriana (Wassell, 2000). En cuadros de SARA inducida mediante suministro de concentrados sin previo acostumbramiento se ha evidenciado la translocación de LPS hacia torrente sanguíneo (Khafipour et al. 2009a) y aumento de Hp en sangre periférica (Gozho et al. 2006).

Si bien el monitoreo de los descensos del pH ruminal es un adecuado indicador de acidosis (Gozho et al. 2005), su medición a nivel de campo es dificultosa y condiciona la obtención de datos precisos. En cambio, la medición y determinación de proteínas en sangre presenta ventajas significativas a nivel práctico. En este experimento, el monitoreo conjunto de pH ruminal y Hp sérica, evidenció que la aplicación de ayuno provoca la activación de una respuesta de fase aguda reflejada en el gran incremento de la concentración de Hp, estos cambios indican que tuvo lugar una respuesta inflamatoria exacerbada compatible a la producida en cuadros de SARA.

Dentro de la evaluación de los parámetros incluidos en el funcional hepático se pudo ver que el nivel de albúmina de todos los animales estuvo dentro del rango normal para la especie bovina (3,20-4,32 g/dL). En los tratamientos sometidos a ayuno la concentración fue mayor durante todo el período de muestreo en comparación al grupo control, pero estas diferencias fueron significativas solo en dos tiempos experimentales -19 y 41 h. Resultados similares se encontraron en cabras y ovejas sometidas a inducción de acidosis donde no se registraron cambios notorios en el nivel de albumina sérica (Viñan et al. 1982; Austin y Wilde, 1985).

En rodeos diagnosticados con SARA se han observado niveles de proteína totales elevados, aunque dentro de los límites fisiológicos (Kleen, et al. 2012). Del mismo modo, en el presente experimento la concentración de proteínas totales registrado en todos los tratamientos se situó siempre dentro del rango considerado normal para los bovinos (5,63-7,17 g/dL). Sin embargo, no se obtuvieron cambios significativos por la aplicación de ayuno, resultado que ha sido reportado en experimentos anteriores (Vihan et al. 1982; Metkari, 2001).

El nivel de globulinas en todos los animales estuvo dentro del rango normal para novillos (3,7-4,2 g/dL) (Coppo, 2015). Estos resultados están en línea con los obtenidos en investigaciones previas de inducción de SARA a través de desafíos con granos o pellets de alfalfa, donde las concentraciones de globulinas y de albúmina se mantuvieron dentro de los valores de referencia (Jones y Allison, 2007; Russell y Roussel, 2007).

Si bien en el presente trabajo solo el tiempo tuvo un efecto significativo sobre la concentración de fosfatasas alcalinas (ALP), se pudo observar que en todos los animales de los tratamientos incluido el grupo control, presentaron concentraciones muy superiores al umbral fisiológico para su especie (142-212 U/L). Teniendo en cuenta que la actividad de ALP es un indicador bioquímico de alteración colestásica (Coppo, 2015), se podría sospechar que existió algún proceso hepático que pudo ocasionar niveles elevados en todos los animales. El tratamiento aplicado no tuvo un efecto significativo sobre el nivel de ALP, hallazgos similares fueron reportados con anterioridad, en casos de acidosis láctica inducida en cabras (Almeida et al. 2008) y en un modelo de prevención de acidosis en bovinos empleando salinomicina, donde ALP no aumentó significativamente en presencia de esta patología (Nagaraja et al. 1985).

Según los resultados obtenidos en este experimento, la concentración de transaminasa glutámico-oxalacética (GOT-AST) en todos los animales superó el nivel fisiológico para la especie bovina (31,0-52,0 U/L) llegando por encima de 100,0 U/L en T24 y T36. El incremento de GOT-AST en los tratamientos T24 y T36 fue significativo en la etapa posterior a la realimentación. Se ha reportado que GOT-AST se eleva en sangre frente a causas de daño parenquimatoso en hígado, lo que da la pauta que, posiblemente, los animales del presente experimento cursaron alguna alteración hepática, además la movilización de reservas grasas se ha vinculado a incrementos de GOT-AST (Wittwer y Böhmwald, 1986; Brown et al. 1999; Rubel et al. 2005; Almeida et al. 2008). En estudios anteriores se han verificado aumentos marcados de esta enzima a partir de las 24 h de realizada la inducción experimental de acidosis (Braun et al. 1992; Patra et al. 1996).

En estudios anteriores de inducción de acidosis en ovejas y cabras, se ha reportado que los valores de la enzima GGT se elevan significativamente debido a procesos de injuria hepatobiliar (Braun et al. 1992; Patra et al. 1996). De forma contraria, en el presente experimento, los niveles de GGT estuvieron por debajo del rango normal de bovinos (26,0-43,0 UI/l) durante todo el experimento en todos los tratamientos. Existen reportes previos donde tampoco fueron encontradas variaciones de esta enzima frente a la inducción experimental de acidosis (Viera et al. 2012).

Se pudo ver un efecto significativo del ayuno sobre el nivel de bilirrubina total. Luego de la realimentación los tratamientos T24 y T36 alcanzaron concentraciones próximas a 1,5 y 2,0 mg/dl respectivamente, cuando en bovinos el nivel normal es del orden de 0,47-1,11 mg/dl. Es posible atribuir este aumento de bilirrubina al incremento de una citoquina proinflamatoria que se origina en procesos inflamatorios. La presencia de esta citoquina afecta la eliminación de bilirrubina y como consecuencia se producen aumento de bilirrubinemia (Assenat et al. 2004). El incremento de la concentración de bilirrubina en la sangre observada en este experimento, está en concordancia con los resultados obtenidos por Nikolov (1998) en búfalos y en ganado ovino (Nikolov, 2003), donde se señala el deterioro de la función hepática como desencadenante de la disminución del *clearance* de bilirrubina.

Tomando en consideración los componentes del funcional hepático es posible interpretar que, si bien el incremento de la concentración de ALP y GOT-AST se produjo en todos los animales participantes del experimento, los elevados niveles bilirrubina en los animales de los grupos T24 y T36, sumado a las concentraciones aún mayores de GOT-AST en T12 y T36, permiten sospechar la ocurrencia de una alteración hepática en los animales sometidos a ayuno.

Los niveles de colesterol durante todo el ensayo se ubicaron por debajo al rango fisiológico propuesto para bovinos (205-277 mg/dl). En las condiciones de este experimento, era de esperar que los niveles de colesterol estuviesen elevados luego de la realimentación, basado en los resultados de investigaciones anteriores realizadas en vacas lecheras suplementadas donde el nivel de colesterol aumentó como reflejo de una mejora en el balance energético, siendo este parámetro indicativo del aumento del consumo de energía (Funston, 2004; Cavestany et al. 2005). La concentración de colesterol está afectada principalmente por el nivel de lipoproteínas en sangre, por tanto, su variación depende en gran medida de la cantidad de lípidos movilizados que son re-esterificados e incluidos en lipoproteínas de baja densidad en hígado (Puppione, 1978). Como ya fue mencionado, el nivel de lipólisis estimado en este ensayo mediante los niveles de AGNE, glucosa e insulina

indican un incremento en el balance energético luego de la realimentación, dato reportado anteriormente en vacas lecheras (Lucy, 2003) sin embargo, los niveles de colesterol obtenidos no estuvieron en el mismo sentido que los otros resultados.

## 12. CONCLUSIONES E IMPLICANCIAS

En base a los resultados alcanzados en el experimento se puede concluir que:

El modelo ayuno-realimentación logró reproducir experimentalmente ambos tipos de acidosis. La presencia de ayuno determinó valores de pH compatibles con cuadros de acidosis ruminal subaguda en los tratamientos sometidos a ayuno de 12 horas y 24 horas y acidosis ruminal aguda en el tratamiento de 36 horas de ayuno.

La evaluación del pH ruminal durante los días siguientes a la aplicación de ayuno permitió demostrar que el rumen es extremadamente dinámico y que fue posible retornar a valores normales a las 70 horas posteriores a una perturbación severa.

Concentraciones intra-ruminales elevadas de ácido láctico entre 32,0 y 51,0 mmol/L no determinaron sintomatología clínica de acidosis ruminal, lo que permitiría interpretar que la concentración de este ácido no es determinante para la expresión clínica de la enfermedad.

El ayuno de 12 horas en animales en etapa final de engorde no determinó un patrón bioquímico compatible con un balance energético negativo, como sí puso observarse en los animales sometidos a ayuno de 24 o 36 horas.

La evaluación conjunta de las concentraciones de Hp en suero y los cambios de pH ruminal durante la inducción de SARA permitieron comprobar experimentalmente la utilidad de Hp como marcador de esta enfermedad en etapas tempranas y en ausencia de signos clínicos manifiestos.

En el presente trabajo se realizó la reproducción experimental de SARA mediante un nuevo modelo inductor de la enfermedad, representando el primer abordaje mediante la aplicación de restricción absoluta al alimento, sin cambios cualitativos ni cuantitativos de la dieta. Si bien el presente experimento evaluó el efecto de un solo episodio de ayuno, permanece como interrogante cómo repercute la repetición de estos eventos, o si varios eventos menores afectan los animales y cuáles serían las consecuencias productivas.

### 13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abell L L, Levy B B, Brodie B B, Kendall F E. (1952). A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. *J Biol Chem.* 195, 357-366.
2. Adams R. F, Jones R. L, Conway P L. (1984). High performance liquid chromatography of microbial acid metabolites. *J Chromatogr.* 336:127.
3. Aguerre M A. (2013a). Aspectos claves del manejo nutricional para el éxito de la salud animal en los corrales de engorde. *XLI Jornadas Uruguayas de Buiatría Paysandú – Uruguay.*
4. Aguerre M, Cajarville C, Kozloski G V, Repetto J L. (2013b). 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. Aguerre M, Cajarville C, Machado V, Persak G, Brambillasca S, Repetto J L. (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.
6. Ahrens F A. (1967). Histamine, lactic acid and hypertonicity as factors in the development of rumenitis in cattle. *Am J Vet Res* 28:1335–1342.
7. Allen M S. (1997). Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. *J. Dairy Sci.* 80:1447–1462.
8. Allison M J. (1969). Biosynthesis of amino acids by ruminal microorganisms. *J Anim Sci* 29:797-807
9. Allison RW. (2012). Laboratory evaluation of the liver. En: Thrall MA, Weiser G, Allison RW, Campbell TW, editors. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry.* 2nd ed. Ames, IA, USA: Wiley-Blackwell Inc. pp. 401–424.
10. Almeida MZPRB, Mendonça CL, Afonso JAB y Miranda Neto EG. (2008). Estudio clínico, hematológico e bioquímico em caprinos submetidos à acidose láctica ruminal induzida experimentalmente. *Vet. Zootec.* 15(1):100-113.
11. Ametaj BN, Koenig KM, Dunn SM, Yang WZ, Zebeli Q y Beauchemin KA. (2009). Backgrounding and finishing diets are associated with inflammatory responses in feedlot steers. *J Anim Sci*,87(4), pp.1314-1320.
12. Andersen PH, Jarlov N. (1990). Investigation of the possible role of endotoxin, TXA2, PGI2 and PGE2 in experimentally induced rumen acidosis in cattle. *Acta Vet. Scand.* 31, 27–38.
13. Annison E F, Lindsay D B, Nolan J V. (2002). Digestion and metabolism. En: Freer M., Dove H. (Eds.). *Sheep Nutrition.* CAB International, Wallingford, UK: 95-118.
14. Aronen I. (1991). Influence of frequency and accuracy of supplement feeding on rumen fermentation, feed intake, diet digestion and performance of growing cattle. 1. Studies with growing bulls fed grass silage ad libitum. *Anim Feed Sci Tech.* 34:49–65.
15. Assenat E, Gerbal-Chaloin S, Larrey D, Saric J, Fabre J M, Maurel P, Vilarem M J and Pascussi J M. (2004). Interleukin 1 $\beta$  inhibits CAR-induced expression of hepatic genes involved in drug and bilirubin clearance. *Hepatology* 40:951–960.
16. Austin A R, Wilde R M. (1985). The effect of sodium monensin on pregnant ewes. *British Veterinary Journal*, v. 141, n. 6, p. 628-634.

17. Bacha F, Llanes N, Bueno E. (2005). Alimentación de terneros en ausencia de promotores de crecimiento de tipo antibiótico: control de timpanismo y acidosis. XXI Curso de especialización FEDNA, 133-158.
18. Banchemin G, Chalkling D, Mederos A. (2016). Relevamiento de problemas sanitarios y de manejo durante la terminación en bovinos en sistemas de confinamiento en Uruguay. *Veterinaria* 52.202: 4-13.
19. Bauer M L, Herold D W, Britton R A, Stock R A, Klopfenstein T J y Yates D A (1995). Efficacy of laidlomycin propionate to reduce ruminal acidosis in cattle. *J. Anim. Sci.* 73: 3445–3454.
20. Beauchemin K A (1991). Ingestion and mastication of feed by dairy cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 7:439-463.
21. Beauchemin K A, Eriksen L, Nørgaard P, Rode L M. (2008). Short communication: salivary secretion during meals in lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci*; 91:2077–2081.
22. Beauchemin K A, Yang W Z and Rode L M. (2003). Effects of particle size of alfalfa-based dairy cow diets on chewing activity, ruminal fermentation, and milk production. *J. Dairy Sci.* 86:630-643.
23. Beauchemin K, Penner G. (2009). New developments in understanding ruminal acidosis in dairy cows. In: *Proceedings of Tri-State Dairy Nutrition Conference*, Ohio State University, Ohio, pp. 1–12.
24. Beckman J L and Weiss W P. (2005). Nutrient digestibility of diets with different fiber to starch ratios when fed to lactating dairy cows. *Journal of dairy science*, 88(3), pp.1015-1023.
25. Beever D E. (1993). Rumen function. In: J. M. Forbes, J. France (Editors). *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*. CAB International, Wallingford (UK), pp. 187- 215.
26. Bergen W G. (2004). Quantitative determination of rumen ciliate protozoal biomass with real-time PCR. *J. Nutr.* 134:3223-3224.
27. Bergman E N. (1990). Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol Rev.* 70:1580–1588.
28. Bergmeyer H U, Horder M y Rej R. (1986). *International Federation of Clinical Chemistry (IFCC)*, 2). *J Clin Chem Clin Biochem* 24(7), 481-495.
29. Berhan T, Puchala R, Sahlu T, Merkel R C, Goetsch A L. (2005). Effects of length of pasture access on energy use by growing meat goats. *J Appl Anim Res* 28:1–7.
30. Bevans D W, Beauchemin K A, Schwartzkopf-Genswein K S, McKinnon J J, McAllister, T A. (2005). Effect of rapid or gradual grain adaptation on subacute acidosis and feed intake by feedlot cattle. *J Anim Sc.* 83(5), pp.1116-1132.
31. Blanch M, Calsamiglia S, DiLorenzo N, DiCostanzo A, Muetzel S, Wallace R J. (2009). Physiological changes in rumen fermentation during acidosis induction and its control using a multivalent polyclonal antibody preparation in heifers. *J Anim Sc.* 87(5), 1722-1730.
32. Blanch M. (2009). Estudio de la acidosis ruminal y nuevas estrategias de prevención. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, España.
33. Bramley E, Lean I J, Fulkerson W J, Stevenson M A, Rabiee A R y Costa N D. (2008). The definition of acidosis in dairy herds predominantly fed on pasture and concentrates. *Journal of Dairy Science*, 91(1), pp.308-321.
34. Braun J P, Benard P, Burgat V. (1983). Gamma-glutamyl transferase in domestic animals. *Vet Res Commun*; 6:77–90.
35. Braun U, Rihs T, Schefer U. (1992). Ruminal lactic acidosis in sheep and goats. *Vet Rec*, v. 130, p. 343-349.

36. Britton R A, Stock R A. (1987). Acidosis, rate of starch digestion and intake. Oklahoma Agric. Exp. Stn., Oklahoma State Univ., Stillwater. MP-121:125–132.
37. Britton R, Stock R y Cornell U. (1989). Acidosis - a continual problem in cattle fed high grain diets. Proceedings: 1989 Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers:8-15.
38. Brodersen R y Vind I. (1963). A Specific Method for Quantitative Determination of Unconjugated Bilirubin and Mesobilirurín. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation, 15(3), 225-232.
39. Brown M S, Hallford D M, Galyean M L, Krehbiel C R, and Duff G. (1999). Effect of ruminal glucose infusion on dry matter intake, urinary nitrogen composition, and serum metabolite and hormone profiles in Ewes. Journal of animal science, 77(11), 3068-3076.
40. Brown M S, Krehbiel C R, Galyean M L, Remmenga M D, Peters J P, Hibbard B, Robinson J, Moseley W M. (2000). Effects of acute and subacute acidosis on dry matter intake, ruminal fermentation, blood chemistry, and endocrine profiles of beef steers. J. Anim. Sci. 78: 3155–3168.
41. Bryant M P, Robinson I M. (1961). Studies on the nitrogen requirements of some ruminal cellulolytic bacteria. Appl Microbiol. 9:96–103.
42. Bryant M P. (1959). Bacterial species of the rumen. Bacteriol Rev, 23(3), p.125.
43. Bryant M P. (1973). Nutritional requirements of the predominant rumen cellulolytic bacteria. Fed Proc 32:1809–1813.
44. Cajarville C, Aguerre M, Repetto J L. (2006a). Ruminal pH, N-NH<sub>3</sub> concentration and forage degradation kinetics on cows grazing temperate pastures and supplemented with different sources of grain. Anim Res: 55: 1-11.
45. Cajarville C, Pérez A, Aguerre M, Britos A, Repetto J L. (2006b). Effect of the timing of cut on ruminal environment of lambs consuming temperate pastures. J Anim Sci 84 / J Dairy Sci 89: 103.
46. Calsamiglia S, Ferret A, Plaixats A J y Devant M. (1999). Effect of pH and pH fluctuations on microbial fermentation in a continuous culture system. J. Dairy Sci. 82(Suppl. 1):38.
47. Calsamiglia S. (1997). Nuevas bases para la utilización de la fibra en dietas de rumiantes. XIII Curso de Especialización FEDN, Madrid.
48. Cassida K A, Stokes M R. (1986). Eating and resting salivation in early lactation dairy cows. J Dairy Sci. 69:1282-1292.
49. Castrillo C, Mota M, Van Laar H, Martín-Tereso J, Gimeno A, Fondevila M, Guada J A. (2013). Effect of compound feed pelleting and die diameter on rumen fermentation in beef cattle fed high concentrate diets. Anim. Feed Sci. Technol. 180, 34–43.
50. Castro T, Manso T, Mantecón A R, Carro M D. (2002). Effect of either once or twice daily concentrate supplementation of wheat straw on voluntary intake and digestion in sheep. Small Rum Res 46: 43–50.
51. Cavestany D, Blanc J E, Kulcsar M, Uriarte G, Chilbroste P, Meikle A, Febel H. (2005). Studies of the transition cow under a pasture-based milk production system: metabolic profiles. J Vet Med 52: 1–7.
52. Ceroni V y Shabani E. (2011). Frequency of the subacute rumen acidosis (SARA) in some cattle farms. Journal of Institute Alb-Shkenca. Vol. IV, Nr. 1, fq. 63 – 67.
53. Cerrato M, Calsamiglia S and Ferret A. (2005). Efectos del tiempo a pH subóptimo y el número de ciclos sobre la fermentación microbiana ruminal en cultivo continuo. XI Jornadas sobre Producción Animal.

54. Chilliard Y, Bocquier F, Doreau M. (1998). Digestive and metabolic adaptations of ruminants to undernutrition, and consequences on reproduction. *Reprod Nutr Dev.* (38):131–52.
55. Chiquette J. (2009). Evaluation of the protective effect of probiotics fed to dairy cows during a subacute ruminal acidosis challenge. *Anim Feed Sci Tech*, 153(3), pp.278-291.
56. Church D C. (1988). Salivary function and production. En: Church, D.C. (Ed.), *The Ruminant Animal, Digestive Physiology and Nutrition*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, pp. 117–124.
57. Church D C. (1993). *El rumiante: fisiología digestiva y nutrición*. Zaragoza, Ed. Acribia, 641p.
58. Clark J H, Klusmeyer T H, Cameron M R. (1992). Symposium: Nitrogen metabolism and aminoacid nutrition in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 75:2304-2323.
59. Coe M L, Nagaraja T G, Sun Y D, Wallace N, Towne E G, Kemp K E and Hutcheson J P. (1999). Effect of virginiamycin on ruminal fermentation in cattle during adaptation to a high concentrate diet and during an induced acidosis. *J. Anim. Sci.* 77:2259–2268.
60. Coffee C J. (1998). Overview of carbohydrate metabolism: The importance of regulating blood glucose levels. En: Coffee, C.J. (1998). *Metabolism*. Ed. Fencehe Creek Publishing. Madison, Connecticut, EEUU, Cap 9, pp.129-139.
61. Cole D J, Roussel A J and Whitney M S. (1997). Interpreting a bovine CBC: Evaluating the leukon and acute-phase proteins. *Vet Med* (1985) (USA).
62. Cole N A, Hutcheson D P. (1979). Feed and water deprivation and rumen function. *J. Anim. Sci.* 49 (Supp.1):187.
63. Cole N A, Hutcheson D P. (1981). Influence on beef steers of two sequential short periods of feed and water deprivation. *J Anim Sci*, 53(4), 907-915.
64. Colman E, Khafipour E, Vlaeminck B, De Baets B, Plaizier J C y Fievez V. (2013). Grain-based versus alfalfa-based subacute ruminal acidosis induction experiments: Similarities and differences between changes in milk fatty acids. *J Dairy Sci*, 96(7), pp.4100-4111.
65. Cooper R J, Klopfenstein T J, Stock R A, Milton C T, Herold D W y Parrott J C. (1999). Effects of imposed feed intake variation on acidosis and performance of finishing steers. *J Anim Sci*, 77(5), pp.1093-1099.
66. Coppo J A. (2015). *Fisiología comparada del Medio Interno*. Ediciones Universidad Católica de Salta (UCASAL), 297 p.
67. Costa E F, Giuliodori M J, Dezzilio M, Romero J. (2003). Mortalidad en un feedlot de La Plata (Buenos Aires-Argentina): causas, distribución mensual e impacto económico. *Analecta veterinaria*.23,1:13-19.
68. Counotte G H M, Lankhorst A, Prins R A. (1983). Role of dl-lactic acid as an intermediate in rumen metabolism of dairy cows. *J Anim Sci* 56, 1222–1235.
69. Counotte G H M, Prins R A, Janssen R H A M, DeBie M J A. (1981). Role of *Megasphaera elsdenii* in the fermentation of dl-[2-13C] lactate in the rumen of dairy cattle. *Appl Environ Microb* 42, 649–655.
70. Dado R G, Allen M S. (1993). Continuous computer acquisition of feed and water intakes, chewing, reticular motility, and ruminal pH of cattle. *J Dairy Sci.* 76:1589–1600.
71. Dann H M, Morin D E, Bollero G A, Murphy M R, Drackley J K. (2005). Parturient intake, postpartum induction of ketosis, and periparturient disorders affect the metabolic status of dairy cows. *J Dairy Sci.* 88, 3249–3264.

72. Danscher A M, Enemark J M D, Telezhenko E, Capion N, Ekstrm C T, Thoenfer M B. (2009). Oligofructose overload induces lameness in cattle. *J Dairy Sci.* 92:607–616.
73. De Vries T J, Dohme F, Beauchemin K A. (2008). Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: Feed sorting. *J. Dairy Sci.* 91, 3958-3967.
74. Debro J R, Traver H y Korner A. (1957). The determination of serum albumin and globulin by a new method. *J Lab Clin Med* 50: 728–732.
75. DeFrain J M, Shirley J E, Titgemeyer E C, Park A F, Ethington R T. (2002). Impact of feeding a raw soybean hull-condensed corn steep liquor pellet on induced subacute ruminal acidosis in lactating cows. *J Dairy Sci*, 85(8), 2000-2008.
76. DeFrain J M, Shirley J E, Titgemeyer E C, Park A F, Ethington R T. (2002). Impact of feeding a raw soybean hull-condensed corn steep liquor pellet on induced subacute ruminal acidosis in lactating cows. *J Dairy Sci.* 85(8), 2000-2008.
77. DeVries T J, Beauchemin K A y von Keyserlingk M A G. (2007). Dietary forage concentration affects the feed sorting behavior of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:5572–5579.
78. DeVries T J, Beauchemin K A, Dohme F, Schwartzkopf-Genswein K S. (2009). Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: feeding, ruminating, and lying behaviour. *J Dairy Sci*; 92:5067–5078.
79. DeVries T J, von Keyserlingk M A, and Beauchemin K A. (2005). Frequency of feed delivery affects the behavior of lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 88(10), 3553-3562.
80. Dewhurst R J, Davues D R, Merry R J. (2000). Microbial protein supply from the rumen. *Anim Feed Sci Technol* 85:1-21.
81. Diario Oficial de la Unión Europea. (2012). Reglamento de Ejecución (UE) N° 481/2012 de la Comisión de 7 de junio de 2012 por el que se establecen las normas de gestión de un contingente arancelario de carne de vacuno de calidad superior. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 8/6/2012.
82. DIEA (2011). Dirección de Estadísticas Agropecuarias. Anuario estadístico agropecuario. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Dirección de Estadísticas Agropecuarias, Uruguay.
83. DIEA (2015). Dirección de Estadísticas Agropecuarias. Anuario estadístico agropecuario. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Dirección de Estadísticas Agropecuarias, Uruguay.
84. Dijkstra J, Boer H, Van Bruchem J, Bruining M, and Tamminga S. (1993). Absorption of volatile fatty acids from the rumen of lactating dairy cows as influenced by volatile fatty acid concentration, pH and rumen liquid volume. *Brit J Nutr*, 69(02), 385-396.
85. Dijkstra J, Ellis J L, Kebreab E, Strathe A B, López S, France J and Bannink A. (2012). Ruminal pH regulation and nutritional consequences of low pH. *Anim Feed Sci Tech*, 172(1), 22-33.
86. Dijkstra J. (1994). Production and absorption of volatile fatty acids in the rumen. *Livest Prod Sci* 39.1 61-69.
87. Dirksen G U, Liebich H G y Mayer E. (1985). Adaptive changes of the ruminal mucosa and their functional and clinical significance. *Bovine Pract.* 20:116–120.
88. Dirksen G. (1969). En. *Third Intr. Symp. Cambridge, Physiology of digestion y metabolism in the ruminant.* Oriel Press Ltd., Newcastle upon Tyne, England, pp. 612.

89. Duffield T, Plaizier J C, Fairfield A, Bagg R, Vessie G, Dick P, Wilson J, Aramini P, McBride BW. (2004). Comparison of techniques for measurement of rumen pH in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87, 59–66.
90. Eckersall P D y Conner J G. (1988). Bovine and canine acute phase proteins. *Vet Res Commun*, 12(2-3), pp.169-178.
91. Eckersall P D, Conner J G. (1990). Plasma haptoglobin in cattle (*Bos taurus*) exists as polymers in association with albumin. *Comp Biochem Physiol*;96B:309–11.
92. Edwards A. (1996). Respiratory diseases of feed lot cattle in the central USA. *Bovine Practice*, 30:5-7.
93. Edwards T A. (2010). Control methods for bovine respiratory disease for feedlot cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*,26(2), pp.273-284.
94. Emmanuel D G, Dunn S M, Ametaj B N. (2008). Feeding high proportions of barley grain stimulates an inflammatory response in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91:606–614.
95. Enemark J M.(2008). The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA): a review. *Vet J*, 176(1), 32-43.
96. Engler M, Defoor P, King C and Gleghorn J. (2014). The impact of bovine respiratory disease: the current feedlot experience. *Animal Health Research Reviews*, 15(02), 126-129.
97. Erdman R A. (1988). Dietary buffering requirements of the lactating dairy cow: A review. *J Dairy Sci* 71:3246-3266.
98. Félix A. (2012). Tesis de maestría: Consumo y digestión de pasturas templadas en terneras: incidencia del tiempo de acceso a la pastura. Facultad de Veterinaria, UdelaR, Uruguay.
99. Fernández N J, Kidney B A. (2007). Alkaline phosphatase: beyond the liver. *Vet Clin Path*, 36(3), 223-233.
100. Ferrer M, Golyshina O V, Chernikova T N, Khachane A N, Reyes-Duarte D, Dos Santos V, Strompl C, Elborough K, Jarvis G, Neef A, Yakimov M M, Timmis K N y Golyshin P N. (2005). Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora. *Environ Microbiol* 7:1996- 2010.
101. Forbes J M, Mayes R W. (2002). Food choice. En: Freer M, Dove H (eds.), *Sheep nutrition*. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 51-69.
102. Forbes J M. (2007) ed. *Voluntary food intake and diet selection in farm animals*. Cabi.
103. Forenbacher S. (1993). Klinička patologija probave i mijene tvari domaćih životinja. Svezak II Jetra. Školska knjiga, Zagreb. pp. 101-112.
104. France J y Dijkstra J. (2005). Volatile fatty acid production. Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism, pp.157-175.
105. Freer M, Dove H, Nolan J V. (2007). Application. En: *Nutrient requirements of domesticated ruminants*, CSIRO Publishing, Collingwood, Australia: 227-233.
106. French N, Kennelly J J. (1990). Effects of feeding frequency on ruminal parameters, plasma insulin, milk yield, and milk composition in Holstein heifers. *J Dairy Sci* 73:1857–1863.
107. Fulton R W. (2009). Bovine respiratory disease research (1983–2009). Cambridge University Press 2009 *Animal Health Research Reviews* 10(2); 131–139.
108. Funston R N. (2004). Fat supplementation and reproduction in beef females. *J Anim Sci.* 82:154-161.

109. Gagea M I, Bateman K G, van Dreumel T, McEwen B J, Carman S, Archambault M, and Caswell J L. (2006). Diseases and pathogens associated with mortality in Ontario beef feedlots. *J Vet Diagn Invest*, 18(1), 18-28.
110. Galyean M L y Rivera J D. (2003). Nutritionally related disorders affecting feedlot cattle. *Can J Anim Sci*, 83(1), pp.13-20.
111. Galyean M L, Lee R W and Hubbert M E. (1981). Influence of fasting and transit on ruminal and blood metabolites in beef steers. *J Anim Sci*, 53(1), 7-18.
112. Galyean M L, Malcom K J, Garcia D R, and Polsipher G D. (1992). Effects of varying the pattern of feed consumption on performance by programmed-fed steers. *Clayton Livest. Res. Ctr. Prog. Rep.*, (78).
113. Garrett E F. (1996). Subacute rumen acidosis. *Large Animal Veterinarian* 51, 6-10.
114. Garrett E F, Pereira M N, Nordlund K V, Armentano L E, Goodger W J and Oetzel G R. (1999). Diagnostic methods for the detection of subacute ruminal acidosis in dairy cows. *J Dairy Sci*, 82(6), pp.1170-1178.
115. Gekara O J, Prigge E C, Bryan W B, Nestor E L, Seidel G. (2005). Influence of sward height, daily timing of concentrate supplementation, and restricted time for grazing on forage utilization by lactating beef cows. *J Anim Sci* 83:1435– 1444.
116. Ghorbani G R, Morgavi D P, Beauchemin K A and Leedle J A Z. (2002). Effects of bacterial direct fed microbials on ruminal fermentation, blood variables, and the microbial populations of feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 80:1977–1986.
117. Giger-Reverdin S, Desnoyers M, Duvaux-Ponter C, Sauvant D. (2011). Modelling within-day variability in feeding behaviour in relation to rumen pH: application to dairy goats receiving an acidogenic diet. In *Modelling nutrient digestion and utilization in farm animals* (pp. 121-129). Wageningen Academic Publishers.
118. Giraud J, Magnano G. (2008). Principales enfermedades que aparecen en los sistemas de engorde a corral en la región XXVIIª Jornadas de Actualización en Ciencias Veterinarias, Villa Giardino, Córdoba, Septiembre, 2008. Disponible: [http://www.produccionanimal.com.ar/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/enfermedades\\_en\\_feedlot/07-giraud.pdf](http://www.produccionanimal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_en_feedlot/07-giraud.pdf). Revisado Julio 2016.
119. Goad D W, Goad C L and Nagaraja T G. (1998). Ruminal microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. *Journal of animal science*, 76(1), pp.234-241.
120. Godson D L, Campos M, Attah-Poku S K, Redmond M J, Cordeiro D M, Sethi M S, Harland R J and Babiuk L A. (1996). Serum haptoglobin as an indicator of the acute phase response in bovine respiratory disease. *Vet Immunol Immunop*, 51(3), pp.277-292.
121. Golder H M, Celi P, Rabiee A R, Heuer C, Bramley E, Miller D W, King R and Lean I J. (2012). Effects of grain, fructose, and histidine on ruminal pH and fermentation products during an induced subacute acidosis protocol." *Journal of dairy science* 95, no. 4: 1971-1982.
122. Golder H M, Celi P and Lean I J. (2014). Ruminal acidosis in 21-month-old Holstein heifer. *Can. Vet. J.* 55:559-564.
123. González L A, Correa L B, Ferret A, Manteca X, Ruíz-de-la-Torre J L and Calsamiglia S. (2009). Intake, water consumption, ruminal fermentation, and stress response of beef heifers fed after different lengths of delays in the daily feed delivery time. *J Anim Sci*, 87(8), 2709-2718.
124. González L A, Manteca X, Calsamiglia S, Schwartzkopf-Genswein K S and Ferret A. (2012). Ruminal acidosis in feedlot cattle: Interplay between feed ingredients, rumen function and feeding behavior (a review). *Anim Feed Sci Tech*, 172(1), 66-79.

125. Gozho G N, Krause D O and Plaizier J C. (2006). Rumen lipopolysaccharide and inflammation during grain adaptation and subacute ruminal acidosis in steers. *Journal of dairy science*, 89(11), pp.4404-4413.
126. Gozho G N, Plaizier J C, Krause D O, Kennedy A D and Wittenberg K M. (2005). Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response. *J. Dairy Sci.* 88:1399–1403.
127. Gozho G N, Plaizier J C, Krause D O. (2007). Ruminal lipopolysaccharide concentration and inflammatory Response during grain induced subacute ruminal acidosis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:856-866.
128. Grant R J, Mertens D R. (1992). Influence of buffer pH and raw corn starch addition on in vitro fiber digestion kinetics. *Journal of Dairy Science*, 75(10), pp.2762-2768.
129. Grant R J. (1994). Influence of corn and sorghum starch on the in vitro kinetics of forage fiber digestion. *J. Dairy Sci.* 77:1563–1569.
130. Gregorini P, Clark C E F, Jago J G, Glassey C B, McLeod K L M, Romera A J. (2009). Restricting time at pasture: effects on dairy cow herbage intake, foraging behaviour, hunger-related hormones, and metabolite concentration during the first grazing session. *J Dairy Sci* 92:4572 (Abstract).
131. Grunder H D. (1977). La signification diagnostique de quelques enzymes sériques chez les bovins. *Point vét*, 6, 49-55.
132. Hammond AC. (2006). Update on BUN and MUN as a guide for protein supplementation in cattle. US Department of Agriculture, Florida, USA. 10 p.
133. Harmon D L, Britton R A, Prior R L, Stock R A. (1985). Net portal absorption of lactate and volatile fatty acids in steers experiencing glucose-induced acidosis or fed a 70% concentrate diet ad libitum. *J Anim Sci* 60:560–569.
134. Harmon D L. (1992). Impact of nutrition on pancreatic exocrine and endocrine secretion in ruminants: a review. *J. Anim. Sci.* 70:1290-1301.
135. Heldt J S, Cochran R C, Stokka G L, Farmer C G, Mathis C P, Titgemeyer E C, Nagaraja T G. (1999). Effects of different supplemental sugars and starch fed in combination with degradable intake protein on low-quality forage use by beef steers. *J Anim Sci* 77:2793-2802.
136. Hess B W, Lake S L, Scholljegerdes E J, Weston T R, Nayigihugu V, Molle J D, Moss G E. (2005). Nutritional controls of beef cow reproduction. *J Anim Sci.* 83: 90–106.
137. Hilton W M. (2014). BRD in 2014: where have we been, where are we now, and where do we want to go?. *Animal Health Research Reviews*, 15(02), 120-122.
138. Hirata M, Iwamoto T, Otozu W, Kiyota D. (2002). The effects of recording interval on the estimation of grazing behavior of cattle in a daytime grazing system. *Asian Austral J Anim* 15:745–750.
139. Holman D B, McAllister T A, Topp E, Wright A D G and Alexander T W. (2015). The nasopharyngeal microbiota of feedlot cattle that develop bovine respiratory disease. *Veterinary Microbiology*, 180(1), 90-95.
140. Hook S E, Steele MA, Northwood KS, Dijkstra J, France J, Wright A D G y McBride B W. (2011). Impact of subacute ruminal acidosis (SARA) adaptation and recovery on the density and diversity of bacteria in the rumen of dairy cows. *FEMS microbiology ecology*, 78(2), pp.275-284.
141. Hoover W H, Miller T K. (1996). Contributions of microbial protein to amino acid supply. En: *Proceeding of the Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers*. Rochester, NY, USA:199-206.

142. Horadagoda N U, Knox K M G, Gibbs H A, Reid S W J, Horadagoda A, Edwards S E R and Eckersall P D. (1999). Acute phase proteins in cattle: Discrimination between acute and chronic inflammation. *Vet. Rec.* 144:437–441.
143. Huber T L. (1976). Physiological effects of acidosis on feedlot cattle. *J Anim Sci* 43:902–909.
144. Hungate R E. (1966). *The Rumen and Its Microbes*. Academic press, New York, NY, USA, pp. 60–64.
145. Huntington G B. (1988). Acidosis. Pages 474-480 in *The ruminant animal, digestive physiology and nutrition*. D. C. Church, ed. Waveland Press, Inc, Prospect Heights, IL, USA.
146. Jason G R, Mantecon A R, Sim D A, Gonzalez J, Foreman E, Bermudez F F, Elston D A. (1999). Can grazing sheep compensate for a daily foraging time constraint? *J Anim Ecol* 68:87–93.
147. INTA Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Balcarce. (2001). Grupo de Sanidad Animal, Estación Experimental Agropecuaria. Manejo Sanitario del feed lot. En: [http://www.produccionanimal.com.ar/sanidad\\_intoxicacionesmetabolicos/enfermedades\\_en\\_feedlot/08manejo\\_sanitario\\_feedlot.pdf](http://www.produccionanimal.com.ar/sanidad_intoxicacionesmetabolicos/enfermedades_en_feedlot/08manejo_sanitario_feedlot.pdf).
148. Iqbal S, Zebeli Q, Mazzolari A, Dunn S M y Ametaj B N. (2012). Barley grain-based diet treated with lactic acid and heat modulated plasma metabolites and acute phase response in dairy cows. *J Anim Sci*, 90(9), 3143-3152.
149. Jafari A, Emmanuel D G, Christopherson R J, Thompson J R, Murdoch G K, Woodward J, Field C J and Ametaj B N. (2006). Parenteral administration of glutamine modulates acute phase response in postparturient dairy cows. *J Dairy Sci* 89:4660–4668.
150. Jones M L y Allison R W. (2007). Evaluation of the ruminant complete blood cell count. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 23:377–402.
151. Jouany J P, Morgavi D P. (2007). Use of “natural” products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *Animal* 1:1443-1466.
152. Jouany J P. (2006). Optimizing rumen functions in the close-up transition period and early lactation to drive dry matter intake and energy balance in cows. *Anim. Prod. Sci.* 96, 250–264.
153. Kamra DN. (2005). Rumen microbial ecosystem. *Current Sci* 89:124-135.
154. Kaneko J J, Harvey J W and Bruss M L. (Eds.). (2008). *Clinical biochemistry of domestic animals*. Academic press.
155. Kaplan M. M. (1972). *Gastroenterology* 62, 452.
156. Kaufmann W, Hagemester H and Dirksen G. (1980). Adaptation to changes in dietary composition, level and frequency of feeding. En: *Digestive physiology and metabolism in ruminants* (pp. 587-602). Springer Netherlands.
157. Kaufmann W. (1976). Influence of the composition of the ration and the feeding frequency on pH regulation in the rumen and on feed intake in ruminant livestock. *Prot Sci* 3:103-108.
158. Kauppinen K. (1984): ALAT, AP, ASAT, GGT, OCT, activities and urea and total bilirubin concentrations in plasma of normal and ketotic dairy cows. *Zbl Vet Med A*, 31, 567-576.
159. Kay R N B. (1966). The influence of saliva on digestion in ruminants. *Wld Rev Nutr and Diet.* 6, 292-328
160. Kennedy E, McEvoy M, Murphy J P, O'Donovan M. (2009). Effect of restricted access time to pasture on dairy cow milk production, grazing behavior and dry matter intake. *J Dairy Sci* 92:168–176.

161. Keunen J E, Plaizier J C, Kyriazakis L, Duffield T F, Widowski T M, Lindinger M I, McBride B W. (2002). Effects of a subacute ruminal acidosis model on the diet selection of dairy cows. *J. Dairy Sci.*,85(12), 3304-3313.
162. Khafipour E, Krause D O, Plaizier J C. (2006). Influence of grain induced sub-acute ruminal acidosis (SARA) on lipopolysaccharide endotoxin (LPS) and acute phase proteins. *Canadian Journal of Animal Science* 86, 577.
163. Khafipour E, Li S, Plaizier J C, Krause D O. (2009a). Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis. *Appl Environ Microbiol. Nov*;75(22):7115-24.
164. Khafipour E., Krause D O and Plaizier J C. (2009b). Alfalfa pellet-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows increases bacterial endotoxin in the rumen without causing inflammation. *J Dairy Sci*, 92(4), pp.1712-1724.
165. Kleen J L, Hooijer G A, Rehage J and Noordhuizen J P T M. (2003). Subacute ruminal acidosis (SARA): a review. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 50(8), pp.406-414.
166. Kleen J L. (2004). Prevalence of subacute ruminal acidosis in Dutch dairy herds – A field study. Tesis doctoral: Tierärztliche Hochschule Hannover, Germany.
167. Kleen J L, Hooijer G A, Rehage J and Noordhuizen J P T M. (2009). Subacute ruminal acidosis in Dutch dairy herds. *Vet Rec.* 164:681–684.
168. Kleen J L, Cannizzo C. (2012). Incidence, prevalence and impact of SARA in dairy herds. *Anim Feed Sci Tech* 172, 4–8.
169. Kohn R A, Boston R C. (2000). The role of thermodynamics in controlling rumen metabolism. In: McNamara, J.P., France, J., Beaver, D.E. (Eds.), *Modelling Nutrient Utilization in Farm Animals*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 11–23.
170. Kohn R A, Dunlap T F. (1998). Calculation of the buffering capacity of bicarbonate in the rumen and in vitro. *Journal of Animal Science* 76, 1702-1709.
171. Kozloski G V. (2011). *Bioquímica dos ruminantes*. 3a. ed. Santa Maria, Rio Grande do Sul, Ed. UFSM, 214 p.
172. Krause K M y Oetzel G R. (2005). Inducing subacute ruminal acidosis in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 88(10), 3633-3639.
173. Krause K M y Oetzel G R. (2006). Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: a review. *Anim Feed Sci. Technol.* 126: 215-236.
174. Krehbiel C R, Britton R A, Harmon D L, Wester T J y Stock R A. (1995). The effects of ruminal acidosis on volatile fatty acid absorption and plasma activities of pancreatic enzymes in lambs. *J Anim Sci* 73:3111–3121.
175. Kristensen N B, Harmon D L. (2004). Splanchnic metabolism of volatile fatty acids absorbed from the washed reticulorumen of steers. *J Anim Sci.* 82:2033–2042.
176. Lean I J, Annison F, Bramley E, Browning G, Cusack P, Farquharson B, Little S y Nandapi D. (2007). *Ruminal acidosis—understandings, prevention and treatment*. Australia. Australian Veterinary Association.
177. Leddin C M, Stockdale C R J, Hill J, Heard W, Doyle P T. (2010). Increasing amounts of crushed wheat fed with Persian clover herbage reduced ruminal pH and dietary fibre digestibility in lactating dairy cows. *Animal Prod Sci* 50, 837–846.
178. Leedle J A Z, Coe M L y Frey R A. (1995). Evaluation of health and ruminal variables during adaptation to grain-based diets in beef cattle. *Am J Vet Res* 56:885–892.
179. Li S, Gozho G N, Gakhar N, Khafipour E, Krause D O y Plaizier J C. (2012). Evaluation of diagnostic measures for subacute ruminal acidosis in dairy cows. *Can J Anim Sci*, 92(3), 353-364.

180. Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L y Randall R J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265-275.
181. Lucy M C. (2003). Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows. *Reproduction* 61: 237-254.
182. Lundin A y Thore A. (1975). Comparison of methods for extraction of bacterial adenine nucleotides determined by firefly assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 30:713
183. Mackie R I, Gilchrist F M C y Heath S. (1984). In vivo study of ruminal microorganisms influencing lactate turnover and its contribution to volatile fatty production. *J Agric Sci.* 103:37.
184. Mackie R I, Gilchrist F M C. (1979). Changes in lactate-producing and lactate-utilising bacteria in relation to pH hydrogen-ion concentration in the rumen of sheep during stepwise adaptation to a high-concentrate diet. *Appl Environ Microbiol.* 67, 422–430.
185. Mackie R I, McSweeney C S, Klieve A V. (2002). Microbial ecology of the ovine rumen. En: Freer M., Dove H. (Eds.). *Sheep Nutrition*. CAB International, Wallingford, UK: 71-94.
186. Maekawa M, Beauchemin K A y Christensen D A. (2002). Chewing activity, saliva production, and ruminal pH of primiparous and multiparous lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85:1176-1182.
187. Marounek M. y Bartos S. (1987). Interactions between rumen amylolytic and lactate-utilizing bacteria in growth on starch. *J Appl Bacteriol.* 63, 233–238.
188. Marshall S A, Campbell C P, Mandell I B, Wilton J W. (1992). Effects of source and level of dietary neutral detergent fiber on feed intake, ruminal fermentation, ruminal digestion in situ, and total tract digestion in beef cattle fed pelleted concentrates with or without supplemental roughage. *J Anim Sci* 70, 884-893
189. Martin C, Brossard L, Doreau M. (2006). Mécanismes d'apparition de l'acidose ruminale latente et conséquences physiopathologiques et zootechniques [mechanisms of appearance of ruminal acidosis and consequences on physiopathology and performances]. (In French, with English abstract). *INRA Prod Anim* 19, 93–108.
190. Mattiauda D A, Tamminga S, Elizondo F, Gibb M, Chilbroste P. (2004). Effect of allowance and timing grazing session on dairy cows grazing permanent pasture. En *Proc. 2nd Symp. Grassl. Ecophysiol. Graz. Ecol.*, Curitiba, Brazil.
191. Meiske J C, Salsbury R L, Hoefler J A, Luecke R W. (1958). The Effect of Starvation and Subsequent Refeeding on some Activities of Rumen Microorganisms. *J Anim Sci*, 17(3), 774-781.
192. Mertens D. R. (1997). Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. *J Dairy Sci* 80:1463–1481.
193. Metkari S. M. (2001). Management of experimentally induced lactic acidosis in goats. *Indian Vet J*, v. 78, p.692-694.
194. Meyer D J, Harvey J W. (1998). Evaluation of hepatobiliary system and skeletal muscle and lipid disorders. *Veterinary Laboratory Medicine. Interpretation and Diagnosis*. 2ª Ed. WB Saunders Company Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokio, 157-187.
195. Meyer D J. (1983). Serum gamma-glutamyltransferase as a liver test in cats with toxic and obstructive hepatic-disease. *J Am Anim Hosp Assoc*, 19(6), 1023-1026.
196. Mink R W y Hespell R B. (1981). Survival of *Megasphaera elsdenii* during starvation. *Current Microbiology*, 5(1), 51-56.
197. Minuti A, Ahmed S, Trevisi E, Piccioli-Cappelli F, Bertoni G, Jahan N, Bani, P. (2014). Experimental acute rumen acidosis in sheep: Consequences on clinical,

- rumen, and gastrointestinal permeability conditions and blood chemistry. *J Anim Sci.* 92(9), pp.3966-3977.
198. Mouriño F, Akkarawongsa R, y Weimer P J. (2001). Initial pH as a determinant of cellulose digestion rate by mixed ruminal microorganisms in vitro. *J Dairy Sci.* 84:848–859.
  199. Muir L A y Barreto A. (1977). U.S. Patent No. 4,061,732. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
  200. Mutsvangwa T, Walton J D, Plaizier J C, Duffield T F, Bagg R, Dick P, Vessie G, McBride B W. (2002). Effects of a monensin controlled-release capsule or premix on attenuation of subacute ruminal acidosis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85, 3454–3461.
  201. Nagaraja T G y Chengappa M M (1998). Liver abscesses in feedlot cattle: A review. *J. Anim. Sci.* 76:287–298.
  202. Nagaraja T G, Avery T B, Galitzer S J y Harmon D L. (1985). Effect of ionophore antibiotics on experimentally induced lactic acidosis in cattle. *Am J Vet Res* 46:2444–2452.
  203. Nagaraja T G, Titgemeyer E C. (2007). Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook 1, 2. *J Dairy Sci*, 90, pp. E17-E38.
  204. Nagaraja TG, Lechtenberg KF. (2007). Acidosis in feedlot cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* Jul;23(2):333-50, viii-ix. Review.
  205. NAHMS (2013). Types and Costs of Respiratory Disease Treatments in U.S. Feedlots 1. USDA, APHIS, National Animal Health Monitoring System. Disponible: [https://www.aphis.usda.gov/animal\\_health/nahms/feedlot/downloads/feedlot2011/Feed11\\_is\\_RespDis.pdf](https://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/feedlot/downloads/feedlot2011/Feed11_is_RespDis.pdf). Acceso: julio 2016.
  206. Nikolov Y. (1998). Clinical experimental studies on acute rumen acidosis in buffaloes (*Bubalus bubalis* L.). V. Influence on several blood and rumen biochemical parameters. *Vet Arh* 68:205–212.
  207. Nikolov Y. (2003). Clinical experimental studies on acute rumen acidosis in sheep with a pre-existing chronic lead and organophosphorus compound intoxication. I Clinical and haematological changes. *Trakia J. Sci.* 1:61–66.
  208. Nocek 2
  209. J E, Allman J G y Kautz W P. (2002). Evaluation of an indwelling ruminal probe methodology and effect of grain level on diurnal pH variation in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85:422-428.
  210. Nocek J E. (1997). Bovine Acidosis: Implications on laminitis. *J. Dairy Sci.* 80:1005-1028.
  211. Nordlund K V y Garrett E F. (1994). Rumenocentesis: A technique for collecting rumen fluid for the diagnosis of subacute rumen acidosis in dairy herds. *Bovine Pract.* 28:109-112.
  212. Nordlund K. (2003). Herd-based diagnosis of subacute ruminal acidosis. In *Proceedings of the American Association of Bovine Practitioners Preconvention Seminar (Vol. 7)*.
  213. Nordlund KV, Garrett EF, Oetzel GR. (1995). Herd-based rumenocentesis: A clinical approach to the diagnosis of subacute rumen acidosis. *Compend Contin Educ Pract Vet.*;17: S48–S56.
  214. Nour M M, Abusamra M T y Hago B E D. (1998). Experimentally induced lactic acidosis in Nubian goats: clinical, biochemical and pathological investigations. *Small Ruminant Res*, 31(1), 7-17.
  215. NRC (1996). Nutrient requirements of beef cattle. Ed. National Academy Press, 7<sup>o</sup> ed. Washington D.C., EEUU.

- 216.NRC (2000). Nutrient Requirements of Beef Cattle. National Academy Press, Washington D.C
- 217.O'Brien MD, Cole LC, Wheelock JB, Sanders SR, Duff GC, Baumgard LH, Rhoads RP. (2008). Thermal and nutritional regulation of hepatic gluconeogenic genes in growing beef cattle. *J Anim Sci* 86. (2): 455-467.
- 218.Oetzel G R (2000). Clinical aspects of ruminal acidosis in dairy cattle. In: Smith, R.A (Ed.), Proceedings of the 33rd Annual Meeting on American Association of Bovine Practice 33, pp. 46–53.
- 219.Oetzel G R. (2001). Introduction to ruminal acidosis in dairy cattle. In Preconvention Seminar 8 34th Annual Convention, September (pp. 11-12).
- 220.Oetzel G R. (2003). Nutritional management and subacute ruminal acidosis in dairy herds. In: 36th Annual Conference of American Association of Bovine Practitioners, Columbus, OH, USA.
- 221.Owens F N, Secrist D S, Hill W J, Gill D R (1998). Acidosis in cattle: a review, *J. Anim. Sci.* 76 275–286.
- 222.Owens F N, Secrist D S, Hill W J, Gill D R. (1997). The effect of grain source and grain processing on performance of feedlot cattle: A review. *J Anim Sci.* 75:868.879.
- 223.Palmonari A, Stevenson D M, Mertens D R, Cruywagen C W, Weimer P J. (2010). pH dynamics and bacterial community composition in the rumen of lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 93: 279-287.
- 224.Patra R C, Lal S B y Swarup D. (1996). Biochemical profile of rumen liquor, blood and urine in experimental acidosis in sheep. *Small Rumin Res.* 19:177–180.
- 225.Pereira D H, Gomes O, Ceolin da Silva B, Leão M I, Valadares Filho S, Martins F H, Garcia R. (2007). Intake and total and partial digestibility of nutrients, ruminal pH and ammonia concentration and microbial efficiency in beef cattle fed with diets containing sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) silage and concentrate in different ratios. *Livest Sci* 107:53–61.
- 226.Pérez J F, Bacells J, Guada J A, Castrillo C. (1997). Rumen microbial production estimated either from urinary purine derivative excretion or from direct measurements of <sup>15</sup>N and purine bases as microbial markers: effect of protein source and rumen bacteria isolates. *J Anim Sci*; 65: 225-236.
- 227.Pérez-Ramírez E, Peyraud J L, Delagarde R. (2009). Restricting daily time at pasture at low and high pasture allowance: Effects on pasture intake and behavioral adaptation of lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 92:3331–3340.
- 228.Pérez-Ramírez E., Delagarde R., Delaby L. (2008). Herbage intake and behavioural adaptation of grazing dairy cows by restricting time at pasture under two feeding regimes. *Animal* 2:1384–1392.
- 229.Pérez-Ruchel A, Repetto J L, Cajarville C. (2013). Suitability of live yeast addition to alleviate the adverse effects due to the restriction of the time of access to feed in sheep fed only pasture. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 97, 1043-1050.
- 230.Pérez-Ruchel A, Repetto J L, Michelini M, Pérez L, Soldini G, Cajarville C. (2009). Rate of intake in wethers fed a temperate pasture with different feeding schedules and supplemented or not with additives. *S. Afr. J Anim Sci* 39 (Supplement 1), 157-160.
- 231.Pérez-Ruchel A. (2006). pH, Amoníaco, Ácidos Grasos Volátiles y Producción de Proteína Microbiana en el Rumen de Corderos, según el Horario de Corte de la Pastura Consumida. Tesis de Grado, Facultad de Veterinaria. UdelaR. 36p.
- 232.Persijn J P y van der Slik W. (1976). A new method for the determination of gamma-glutamyltransferase in serum. *J Clin Chem Clin Biochem* 14:421–427.

233. Pers-Kamczyc E, Zmora P, Cieslak A y Szumacher-Strabel M. (2011). Development of nucleic acid based techniques and possibilities of their application to rumen microbial ecology research. *J. Anim. Feed Sci.* 20:315–337.
234. Phillips C J C y Rind M I. (2001). The effects of frequency of feeding a total mixed ration on the production and behavior of dairy cows. *J Dairy Sci.* 84:1979–1987.
235. Plaizier J C, Krause D O, Gozho G N y McBride B W. (2008). Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences. *The Vet J*, 176(1), pp.21-31.
236. Plaizier J C, Krause D O, Gozho G N, McBride B W. (2009). Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences. *Vet J* 176, 21–31.
237. Puppione D L. (1978). Implications of unique features of blood lipid transport in the lactating cow. *J Dairy Sci.* 61:651–659.
238. Rabelo E, Rezende R L, Bertics S J y Grummer R R. (2003). Effects of transition diets varying in dietary energy density on lactation performance and ruminal parameters of dairy cows. *J of Dairy Sci* 86(3), pp.916-925.
239. Rabiee A R y I J Lean. (2012). Evaluation of diagnostic tests used for ruminal subacute acidosis using receiver-operating characteristic (ROC) analysis.
240. Reynolds C K. (2006). Production and metabolic effects of site of starch digestion in dairy cattle. *Anim Feed Sci Technol.* 130:78–94.
241. Rietschel E T, Kirikae T, Shade F, Mamat U, Schmidt G, Lappnow H, Ulmer A J, Zahringer U, Seydel U y Di Padova E E. (1994). Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB.* 8.: 217-225.
242. Robles V, González L A, Ferret A, Mantexa X, Calsamiglia S. (2007) Effects of feeding frequency on intake, ruminal fermentation, and feeding behavior in heifers fed high-concentrate diets. *J Anim Sci*; 85:2538–2547.
243. Rubel D, Prepelitchi L, Kleiman F, Carnevale S, Wisnivesky-Colli C. (2005). Estudio del foco en un caso de fasciolosis humana en Neuquén. *Medicina (Buenos Aires)* 65: 207–212.
244. Rumsey T S. (1978). Effects of dietary sulfur addition and synovex-S ear implants on feedlot steers fed an all-concentrate finishing diet. *J Animal Sci* 46:463.
245. Russell J B, Dombrowski D B. (1980). Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Appl Environ Microbiol* 39, 604–610.
246. Russell J B, Hespell R B. (1981). Microbial rumen fermentation. *J Dairy Sci*; 64: 1153-1169.
247. Russell J B, Allen M S. (1983). Physiological basis for interaction among rumen bacteria: *Streptococcus bovis* and *Megasphaera elsdenii* as a model. En: Klug M J, Reddy CA (Eds.), *Current Perspectives in Microbial Ecology*. American Society of Microbiology, Washington, DC, pp. 239–247.
248. Russell J B y Hino T. (1985). Regulation of lactate production in *Streptococcus bovis*: A spiraling effect that contributes to rumen acidosis. *J Dairy Sci* 68:1712–1721.
249. Russell J B y Strobel H J. (1987). Concentration of ammonia across cell membranes of mixed rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* 70:970-976
250. Russell J B. (1996). Dairy Forage Research Center. Informational Conference with dairy and forage and industries. USA: 61p.
251. Russell J B y Wilson D B. (1996). Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *J Dairy Sci* 79:1503–1509.

252. Russell J B, Wallace R J. (1997). Energy-yielding and energy-consuming reactions. In *The rumen microbial ecosystem* (pp. 246-282). Springer Netherlands.
253. Russell K E y Roussel A J. (2007). Evaluation of the ruminant serum chemistry profile. *Vet. Clin. North Am. Food Anim Pract* 23:403–426.
254. Sato S. (2016). Pathophysiological evaluation of subacute ruminal acidosis (SARA) by continuous ruminal pH monitoring. *Anim Sci J*, 87(2), 168-177.
255. Satter L D y Roffler R E. (1975). Nitrogen requirement and utilization in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 58(8), 1219-1237.
256. Satter LD, Slyter L L. (1974). Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. *British Journal of Nutrition*. 32:199–208.
257. Sauviant D, Giger-Reverdin S y Meschy F. (2006). Le contrôle de l'acidose ruminale latente. *Productions animales-paris-institut national de la recherche agronomique*, 19(2), p.69.
258. Sauviant D, Mertens D R. (1998). Dietary characteristics affecting ruminal acidosis. *Annual Research Summaries 1998. US Dairy Forage Research Center, Madison, WI*; (Pages 63–65).
259. Schwartzkopf-Genswein K S, Beauchemin K A, McAllister T A, Gibb D J, Streeter M y Kennedy A D. (2004). Effect of feed delivery fluctuations and feeding time on ruminal acidosis, growth performance, and feeding behavior of feedlot cattle. *Journal of animal science*, 82(11), 3357-3365.
260. Silva del Rio N, Heguy J M y Lago A. (2010). Feed management practices on California dairies. In *Journal of Dairy Science* (Vol. 93, pp. 773-773). 360 Park Ave South, New York, NY 10010-1710 USA: Elsevier Science Inc.
261. Slyter L L. (1976). Influence of acidosis on rumen function. *J Anim Sci*. 43:910–929.
262. Smith RA. (1996). Work with producers to reduce economic losses of BRD in stocker and feeder cattle. *DMV* 27:1F-3F.
263. Smith RA. (1998). Impact of disease on feedlot performance: a review. *J Anim Sci* 76: 272-274.
264. Sniffen C J, Thomas H H. (1991). Dairy nutrition management. *Vet Clin North Am, Food Anim Pract*; 7: 632.
265. Soca P, Beretta V, Heizen M, Bentancur O. (2002). Effect of pasture height and control of grazing time on grazing behaviour and defoliation dynamics of growing beef cattle. En: *Proc Symp Resp Incr Global Demand Anim Prod, Yucatán, México*:132–133.
266. Soto-Navarro S A, Krehbiel C R, Duff G C, Galyean M L, Brown M S, Steiner R L. (2000). Influence of feed intake fluctuation and frequency of feeding on nutrient digestion, digesta kinetics, and ruminal fermentation profiles in limit-fed steers. *J Anim Sci*. 78:2215–2222.
267. Statistical Analysis Systems (SAS) 2009. *SAS/STAT User's Guide. Release 9.1.2.* SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
268. Stern M D, Calsamiglia S, Endres M I. (1994). Dinámica del metabolismo de los hidratos de carbono y del nitrógeno en el rumen. En: Stern M.D., Calsamiglia S., Endres M.I. *Nuevos sistemas de valoración de alimentos y programas alimenticios para especies domésticas*. Ed. FEDNA, Madrid pp. 177-194.
269. Stewart C S, Flint J F y Bryant M P. (1997). The rumen bacteria. Pages 10-72 in *The rumen microbial ecosystem*. 2nd ed. P. N. Hobson and C. S. Stewart, ed. Blackie Academic and Professional, London, UK.

270. Stewart C S. (1977). Factors affecting the cellulolytic activity of rumen contents. *Appl Environ Microbiol* 33, 497–502.
271. Stewart W E, Stewart D G y Schultz L H. (1958). Rates of volatile fatty acid production in the bovine rumen. *Journal of Animal Science*, 17(3), 723-736.
272. Stock R y Smith R A. (2000). Acidosis in cattle: an overview. In *Proceedings of the Thirty-Third Annual Conference, American Association of Bovine Practitioners, Rapid City, South Dakota, USA, September 21-23, 2000* (pp. 30-37). American Association of Bovine Practitioners.
273. Stock RA y Britton RA. (1993). Acidosis in Feedlot Cattle. In: *Scientific Update on Rumensin/Tylan for the Profession Feedlot Consultant*. Elanco Animal Health, Indianapolis, IN. p A-1.
274. Tajik J, Nazifi S. (2011). Diagnosis of subacute ruminal acidosis: A review. *Asian Journal of Animal Sciences* 5, 80–90.
275. Tajima K, Aminov R I, Nagamine T, Matsui H, Nakamura M y Benno Y. (2001). Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 67:2766–2774.
276. Tajima K, Arai S, Ogata K, Nagamine T, Matsui H, Nakamura M, Aminov RI, Benno Y. (2000). Rumen bacterial community transition during adaptation to high-grain diet. *Anaerobe* 6:273-284.
277. Tennant B C, Center S A. (2008). Hepatic function. *Clinical biochemistry of domestic animals*, 5, 327-352.
278. Therion J J, Kistner A, Kornelius J H. (1982). Effect of pH on growth rates of rumen amylolytic and lactilytic bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 44, 428–434.
279. Tietz N W, Burtis C A, Duncan P, Ervin K, Petitclerc C J, Rinker A D, Shuey D y Zygowicz E R. (1983). A reference method for measurement of alkaline phosphatase activity in human serum. *Clin Chem*. 29:751–761.
280. Tourlomoussis P, Eckersall P D, Waterson M M y Buncic S. (2004). A comparison of acute phase protein measurements and meat inspection findings in cattle. *Foodborne Pathog. Dis.* 1:281–290.
281. Trevisi E, Zeconi A, Bertoni G, Piccinini R. (2010). Blood and milk immune and inflammatory profiles in periparturient dairy cows showing a different liver activity index. *Journal of Dairy Research* 77, 310–317.
282. Tripathi M K, Santra A, Chaturvedi O H, Karim S A. (2004). Effect of sodium bicarbonate supplementation on ruminal fluid pH, feed intake, nutrient utilization and growth of lambs fed high concentrate diets. *Anim Feed Sci Technol*. 111: 27-39.
283. Van Harmelen V, Reynisdottir S, Cianflone K, Degerman E, Hoffstedt J, Nilsell K, Sniderman A, Arner P. (1999). Mechanisms involved in the regulation of free fatty acid release from isolated human fat cells by acylation-stimulating protein and insulin. *J Biol Chem*. 274:18243–18251.
284. Van Soest, P J. (1982). *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Cornell University Press. Ithaca, New York.
285. Van Soest, P J. (1994). *Nutritional ecology of the ruminant*. Cornell University Press.
286. Viera A C, Câmara A C, Afonso J A B, Mendonça C L. (2012). Perfil hematológico e bioquímico de ovinos suplementados com salinomicina submetidos à acidose láctica ruminal. *Ciência Animal Brasileira*, 13, 259-271.
287. Vihan V S, Wani G M, Sahni K L. (1982). Observation on changes in blood serum in experimental rumen acidosis in goats. *Indian Vet J*, v. 59, p. 998-1000.

288. Voelker J A y Allen M S. (2003). Pelleted beet pulp substituted for high-moisture corn: 3. Effects on ruminal fermentation, pH, and microbial protein efficiency in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 86(11), pp.3562-3570.
289. Vogel G L y Parrot J C. (1994). Mortality survey in feedyards: the incidence of death from digestive, respiratory and other causes in feedyards of the Great Plains. *The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian*, 16: 227-234.
290. Wassell J. (2000). Haptoglobin: Function and polymorphism. *Clin Lab (Zaragoza)* 46:547–552.
291. Weatherburn M W. (1967). Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal Chem*, 39(8), 971-974.
292. Webb D W, Head H H, Wilcox C J. (1969). Effect of age and diet on fasting blood and plasma glucose levels, plasma nonesterified fatty acid levels, and glucose tolerance in dairy calves. *J Dairy Sci*. 52:2007–2013.
293. Webster D A. (1977). An immediate reaction between bromocresol green and serum as measures of albumin content. *Clin Chem* 24:663-665.
294. Werling D, Sutter F, Arnold M, Kun G, Tooten P C, Gruys E, Kreuzer M y Langhans W. (1996). Characterization of the acute phase response of heifers to a prolonged low dose infusion of lipopolysaccharide. *Res Vet Sci* 61:252–257.
295. Wheelock J B, Rhoads R P, Vanbaale M J, Sanders S R, Baumgard L H. (2010). Effects of heat stress on energetic metabolism in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci*. 93: 644–655.
296. Wittwer F, Böhmwald, H. (1986). *Manual de patología clínica veterinaria*. Central de Publicaciones Universidad Austral de Chile, 1ra Ed., Valdivia, Chile.
297. Zebeli Q, Metzler-Zebeli B U, Ametaj B N. (2012). Meta-analysis reveals threshold level of rapidly fermentable dietary concentrate that triggers systemic inflammation in cattle. *J Dairy Sci* 95, 2662–2672.
298. Zimmerman HJ, Dujovne CA, Levy R. (1968). The correlation of serum levels of two transaminases with tissue levels in six vertebrate species. *Comp Biochem Physiol* 25, 1081–1089.