



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**FACTORES SOCIALES QUE INFLUYEN SOBRE EL DESARROLLO DE LAS
VAQUILLONAS DURANTE EL PERÍODO PERI-PUBERAL**

María Carolina Fiol Lepera

TESIS DE DOCTORADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

**URUGUAY
2018**



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**FACTORES SOCIALES QUE INFLUYEN SOBRE EL DESARROLLO DE LAS
VAQUILLONAS DURANTE EL PERÍODO PERI-PUBERAL**

María Carolina Fiol Lepera

**Rodolfo Ungerfeld Morón, MSc PhD
Director de Tesis**

**Mariana Carriquiry Fossemale, PhD
Co-Directora de Tesis**

2018

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

Pablo Chilibroste Symonds; Ing. Agr., MSc, PhD
Departamento de Producción Animal y Pasturas
Facultad de Agronomía
Universidad de la República – Paysandú, Uruguay

Raquel Pérez Clariget; DV, MSc, PhD
Departamento de Producción Animal y Pasturas
Facultad de Agronomía
Universidad de la República – Montevideo, Uruguay

Adroaldo Zanella, MV PhD
Departamento de Medicina Veterinaria Preventiva y Salud Animal
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad de San Pablo - Pirassununga, SP - Brasil



**FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados**

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

DE DOCTORADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

**“Factores sociales que influyen sobre el desarrollo de las
vaquillonas durante el período peri-puberal”**

Por: María Carolina Fiol Lepera

**Director de Tesis: Dr. Rodolfo Ungerfeld
Codirectora de Tesis: Dra. Mariana Carriquiry**

Tribunal

Presidente: Dra. Raquel Pérez Clariget

Segundo Miembro: Dr. Pablo Chilibroste

Tercer Miembro: Dr. Adroaldo Zanella

Fallo del Tribunal: Aprobada con Mención

IPAV, Libertad, San José, 10 de setiembre de 2018

El Fallo de aprobación de la Tesis puede ser: Aprobada (corresponde a la nota BBB- en el Acta), o Aprobada con Mención (corresponde a la nota SSS- 12 en el Acta)



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay

CENTRO DE POSGRADO

FUNDAMENTACIÓN DE LA CALIFICACIÓN DEL TRIBUNAL, DEFENSA DE TESIS DOCTORAL DE LA DRA. CAROLINA FIOI

El tribunal reunido en el día de la fecha y luego de la presentación y defensa de la tesis doctoral por parte de Carolina Fiol quieren destacar que la tesis fue conducida con solvencia y compromiso a pesar de las dificultades que los trabajos experimentales implicaron. Se remarca la claridad de las preguntas que la tesis realizó, el abordaje que se utilizó para testear las hipótesis, la adecuación de las metodologías, empleadas y la interpretación y análisis de los resultados. La tesis incluye tres artículos publicados en revistas de alto impacto en el área del conocimiento en que se enmarca la tesis. La presentación oral del trabajo fue excelente y la defensa se realizó con amplia solvencia. La doctoranda demostró un conocimiento profundo de su trabajo y de la literatura internacional sobre el tema, así como seguridad en el intercambio académico y honestidad intelectual al defender su tesis. El tribunal felicita Carolina Fiol por su brillante desempeño.

Dra. Raquel Pérez (Presidente) - Dr. Pablo Chilibroste - Dr. Adroaldo Zanella

A MI MAMÁ, NENUCHA
Te extraño todos los días...pero sé que estás conmigo

AGRADECIMIENTOS

A Joaco y Manu, por ser la luz de mi vida, hacerme más llevaderos los momentos difíciles, y obligarme a intentar ser un poco mejor persona cada día.

A Martín, por todo lo que ha aportado a la realización de éste doctorado, y más que nada por quererme, bancarme, y creer en mí, muchas veces, más que yo misma.

A mis padres, Nenucha y Bernardo, por estar siempre que los necesito, por enseñarme lo que es el amor incondicional, no hay palabras para agradecerles...

A mis hermanos: Vero, sin vos todo hubiera sido más difícil aún, y Eduardo, y a todo el resto de mi familia, por su ayuda diaria, y en especial mis adorados sobrinos, Mateo, Gonzalo, Juan Pablo, Valentina y Gastón, por alegrarme la vida.

A Fer Nozar, amiga y parte de nuestra familia, por el apoyo constante.

A mis amigas, por la unión que mantenemos a lo largo de tantos años; a Solana, Matías, Juan Pablo, Florencia, y Vanesa, por ser buenos compañeros en todos los momentos.

A todos los que colaboraron en distintas etapas de éste trabajo, por su ayuda, esfuerzo y dedicación:

A Unge, por seguir orientándome en éste proceso, y a Mariana, por sumarse a éste proyecto.

A Joselo, por facilitar que pueda seguir investigando en lo que me gusta, y a mis compañeros de trabajo: Álvaro, Ale Mendoza, Germán, Eduardo, Gonzalo, Coco, Analía, Ale Britos, Alsiane, Nicolle, Maxi, Juan, Cinthia y Cecilia, por hacer posible el buen ambiente de trabajo que tenemos.

A los Tesistas de grado, todos ellos ahora ya Médicos Veterinarios: Nicolás Curbelo, Gabriel Larraz, Annie dos Santos, Augusto Lacava, Ana Maverino, Ma. Noel Méndez, Guillermo Matto, Francisco Triay, Ignacio Donadio, Leticia Eustathiou, y Verónica Sánchez.

A Leonardo de Melo Menezes, Stephani Bacchini, y a Tatiana Morales, Ma. Laura Núñez, Daniela Carnales, Mariana García, Estefanía Mesa, Fiorella Scaglione, Pilar Alvez.

A Ana Laura Astessiano, Alberto Casal, y Gretel Ruprechter, por su ayuda en diferentes mediciones, y a Gilberto Vilmar Kozloski de la UFSM por responder a todas mis consultas y posibilitar la realización del análisis de cromosomas, todo ello sin condiciones.

A Fernando Perdigón, Elena de Torres y a todo el personal de los Campos Experimentales de la Facultad: José Hernández, Jorge Olivero, Jorge Rodríguez, Gustavo Cazard, Damián Sosa, y especialmente a Federico de León.

Al Programa de Posgrados de la Facultad de Veterinaria por la oportunidad de realizar el Doctorado; a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (Proyecto Fondo Clemente Estable) y a la Comisión Sectorial de Investigación Científica (Proyecto Vinculación Universidad-Sector Productivo Mod. II) por la financiación de los dos proyectos que posibilitaron la realización de los trabajos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.....	3
La recría en los sistemas de producción de bovinos.....	3
Factores ambientales que influyen sobre el desarrollo en bovinos.....	4
Bioestimulación en rumiantes.....	6
Mecanismo de respuesta a la bioestimulación.....	7
Jerarquía social y dominancia.....	8
Dominancia y producción en vaquillonas de razas lecheras.....	9
Crecimiento y regulación metabólica en vaquillonas.....	10
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
HIPÓTESIS.....	14
OBJETIVOS.....	15
ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN.....	16
EXPERIMENTO I- Publicación I.....	17
EXPERIMENTO II- Publicación II y III.....	19
Materiales y Métodos.....	19
Resultados.....	20
DISCUSIÓN GENERAL.....	27
CONCLUSIONES GENERALES.....	31
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
ANEXOS.....	41

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro I. Desarrollo folicular en vaquillonas expuestas (GE; n = 15) y aisladas (GC; n = 14) de novillos androgenizados durante 80 días.....	18
Cuadro II. Ingredientes y composición de nutrientes de las dietas.....	19
Cuadro III. Parámetros de desarrollo corporal en vaquillonas dominantes (DOM; n = 8) y subordinadas (SUB; n = 8) mantenidas en condiciones de competencia durante 120 días....	21
Cuadro IV. Concentración de hormonas y metabolitos sanguíneos en vaquillonas dominantes (DOM; n = 8) y subordinadas (SUB; n = 8) mantenidas en condiciones de competencia durante 120 días.....	22
Cuadro V. Frecuencia de actividades (%) en las primeras 5 h posteriores a la administración del alimento en vaquillonas dominantes (DOM; n = 8) y subordinadas (SUB; n = 8) mantenidas en condiciones de competencia durante 120 días.....	23
Cuadro VI. Frecuencia de actividades (%) en las últimas 6 h posteriores a la administración del alimento en vaquillonas dominantes (DOM; n = 8) y subordinadas (SUB; n = 8) mantenidas en condiciones de competencia durante 120 días.....	23
Cuadro VII. Consumo de materia seca (CMS) y tasa de consumo en vaquillonas dominantes (DOM; n = 8) y subordinadas (SUB; n = 8) mantenidas en condiciones de competencia durante 120 días.....	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Concentración de LH (media \pm EEM) media (panel superior) y basal (panel inferior) en las vaquillonas expuestas (GE; n = 8) y aisladas (GC; n = 8) de novillos androgenizados (NA) durante 80 días. Día 0 = inicio de la exposición del GE a los NA (1600 h). El muestreo de sangre se realizó cada 15 min durante 6 h (0800 a 1400 h) al día -10, 1, 10, 20 y 30. Los días en que existieron diferencias en las concentraciones medias y basales de LH se presentan con * ($P < 0,001$) y ** ($P \leq 0,05$).....	18
Figura 2. Cantidad de folículos ováricos en vaquillonas dominantes (n = 8; barras negras) y subordinadas (n = 8; barras blancas) mantenidas en condiciones de competencia durante 120 días. Diferencias significativas entre grupos para cada día se indican con * ($P \leq 0,05$).....	21
Figura 3. Concentración media de glucosa (panel superior) y colesterol (panel inferior) en vaquillonas dominantes (línea continua) y subordinadas (línea punteada) mantenidas en condiciones de competencia durante 120 días.....	22
Figura 4. Frecuencia de actividades de rumia y descanso durante las primeras 5 h de registro (total 12 de h en cada periodo; h 0 = suministro de la RTM) en vaquillonas dominantes (n = 8; barras blancas) y subordinadas (n = 8; barras blancas) mantenidas en condiciones de competencia durante 120 días. * $P \leq 0,05$	24
Figura 5. Frecuencia de actividades comiendo, rumiando y echadas a lo largo de las 12 h de registro de comportamiento (cada hora corresponde a la media de 7 periodos) en vaquillonas dominantes (n = 8; barras negras) y subordinadas (n = 8; barras blancas) mantenidas en condiciones de competencia durante 120 días. * $P < 0,05$ (en cada hora)...	25

RESUMEN

Los objetivos de esta tesis de doctorado fueron: 1) caracterizar el patrón de secreción de LH y el desarrollo folicular en los primeros 30 d de exposición de vaquillonas en anestro a novillos androgenizados (NA), y determinar si la bioestimulación durante 80 d adelanta el inicio de la ciclicidad (Experimento I), y 2) comparar el desarrollo corporal y reproductivo, el estatus metabólico, el consumo de alimento individual, la tasa de consumo, y el comportamiento ingestivo de vaquillonas de leche prepuberales dominantes (DOM) y subordinadas (SUB) mantenidas en situaciones de competencia durante 120 d (Experimento II). En el Exp. I se utilizaron 29 vaquillonas Hereford en anestro y 6 NA. Las vaquillonas fueron adjudicadas a 2 grupos: 1) expuestas a NA (GE; n=15), y 2) control, aisladas de NA y de otros machos (GC; n=14). Ambos grupos fueron mantenidos a campo natural en dos potreros (separados 1000 m) durante 80 d. Luego de 10 d de exposición a los machos, las concentraciones medias (1,6 vs 0,8 ng/mL; EEM = 0,1) y basales (1,5 vs 0,7 ng/mL; EEM = 0,1) de LH fueron mayores en el GE que en GC. El diámetro folicular medio (DFM; 8,0 vs. 7,5 mm; EEM = 0,1) y la proporción de vaquillonas cíclicas al día 60 (33,3 vs 0%), 70 (47 vs 0%) y 80 (53 vs 0%) fueron mayores en el GE que en el GC. En el Exp. II se utilizaron 16 vaquillonas Holando y Holando x Jersey que fueron asignadas a 8 díadas y mantenidas a corral durante 120 d. Las vaquillonas DOM fueron más pesadas (269,3 vs 265,3 kg; EEM = 1,5) y tuvieron mayores ganancias diarias de peso (0,858 vs 0,770 kg/d; EEM = 0,02) que las SUB. A su vez, las vaquillonas DOM presentaron un mayor DFM (10,0 vs 9,0 mm; EEM = 0,3) y alcanzaron la pubertad antes que las SUB (313,9 ± 4,9 d vs 329,6 ± 5,7 d). Las concentraciones de glucosa también fueron mayores en las DOM que en las SUB (89,2 vs 86,8 mg/dL; EEM = 1,2), mientras que las SUB tuvieron mayores concentraciones de colesterol que las DOM (86,1 vs 90,2 mg/dL; EEM= 2,6). En las primeras 5 h de administrado el alimento, las DOM estuvieron más tiempo rumiando y echadas que las SUB, mientras que las SUB estuvieron más tiempo paradas que las DOM. Las SUB tuvieron una mayor tasa de consumo que las DOM en el Periodo II, sin diferencias en el consumo de alimento entre ambas. Se concluyó que: 1) el estímulo de la secreción de LH y del desarrollo folicular serían responsables del adelanto en el inicio de la ciclicidad de las vaquillonas expuestas a los machos en comparación con las aisladas, y 2) las vaquillonas DOM presentaron mayores ganancias diarias de peso y niveles de glucosa, y fueron reproductivamente más precoces que las SUB. A su vez, existieron diferencias en el comportamiento ingestivo entre vaquillonas de ambos rangos sociales, lo que puede vincularse a diferentes estrategias de adaptación frente a situaciones de competencia de acuerdo al estatus social.

SUMMARY

The objectives of this PhD thesis were to: 1) characterize the LH secretion pattern and the follicular development of anestrus beef heifers during the first 30 d of exposure to androgenized steers (AS) and to determine if exposure to AS for 80 d advances the onset of ovarian cyclic activity (Experiment I), and 2) to compare body and reproductive development, metabolic status, individual dry matter intake, intake rate and behavioral time budget of dominant (DOM) and subordinate (SUB) prepubertal dairy heifers allocated in competitive dyads during 120 d (Experiment II). In Exp. I, 29 anestrus Hereford heifers were allocated to 2 homogeneous groups: 1) exposed to AS (EH; n=15), and 2) control, isolated from AS and any other male (CH; n=14). Both groups grazed native pastures in 2 paddocks (separated 1000 m) during 80 d. After 10 d of male exposure, LH concentrations, either mean (1.67 vs. 0.88 ng/mL; SEM = 0.09) or basal (1.53 vs. 0.74 ng/mL; SEM = 0.09), were greater in the EH group than in the CH group. The maximum follicular diameter (MFD) was greater in EH than in CH (8.00 ± 0.16 mm vs. 7.52 ± 0.17 mm), and cumulative proportions of heifers that started to cycle were greater in EH than in CH on d 60 (33.3 vs. 0%), 70 (47 vs. 0%), and 80 (53 vs. 0%) of the exposure period. In Exp. II, 16 Holstein and Jersey \times Holstein prepubertal heifers were assigned to 8 homogeneous dyads. Dyads were housed in pens during 120 d, receiving a total mixed ration daily. Heifer BW (269.3 vs. 265.3 ± 1.5 kg) and average daily gains (0.858 vs. 0.770 kg/d; SEM = 0.02) were greater in DOM than SUB. Dominant heifers had a greater MFD (10.0 vs. 9.0 mm; SEM = 0.3) and achieved puberty earlier than SUB (313.9 ± 4.9 vs. 329.6 ± 5.7 d). In addition, glucose concentrations were greater in DOM than SUB heifers (89.2 vs. 86.8 mg/dL; SEM = 1.2), but cholesterol concentrations were greater in SUB than in DOM (86.1 vs 90.2 mg/dL; SEM = 2.6). During the first 5h after feed delivery, DOM heifers spent more time ruminating and lying than SUB heifers, while SUB spent more time standing than DOM heifers. No differences were found on dry matter intake between DOM and SUB, but SUB ate at a faster rate on period II compared to DOM heifers. In conclusion: 1) the stimulus on LH secretion and follicular development were at least in part responsible for the earlier onset of cyclic activity in heifers exposed to NA than in isolated ones, 2) DOM heifers were more precocious, heavier and had greater glucose concentrations than SUB. In addition, there were differences on behavioral time budget between heifers of different social status, thus, it is expected that heifers will cope with competitive situations differently according to their social position.

INTRODUCCIÓN

La evaluación de alternativas de manejo que optimicen los sistemas de recría de vaquillonas, tanto de carne como de leche, es uno de los temas que han adquirido mayor relevancia en los últimos 25 años (Roche et al., 2015; Heinrichs et al., 2017). La optimización de dichos sistemas implica incrementar la vida productiva de la hembra, maximizando la productividad, tanto en el peso de los terneros o en la cantidad de leche producida (Wathes et al., 2014; Diskin & Kenny, 2016). En los sistemas de producción de leche, el costo de criar las terneras y vaquillonas de reemplazo representa el segundo mayor costo variable luego de la alimentación (Tozer & Heinrichs, 2001). Por lo tanto, el mantenimiento de estos animales improductivos determina que el objetivo primario en esta etapa sea disminuir la edad al primer servicio y al parto, logrando un buen desarrollo de las hembras, y minimizando los costos asociados a dicha actividad (Day & Anderson, 1998; Abeni et al., 2000). Para lograr dichos objetivos, tanto en vaquillonas de carne como de leche, se debería alcanzar el primer parto a los 24 meses (rango = 23-25 meses), para lo que es necesario lograr que el servicio no sea posterior a los 15 meses (Wathes et al., 2014; Diskin & Kenny, 2014). Por tanto, el inicio temprano de la pubertad se vuelve esencial para lograr una menor edad al primer entore y a la primera concepción (Lesmeister et al., 1973). A su vez, existe una relación positiva entre la cantidad de celos previos al inicio del entore, y el desempeño reproductivo posterior de las vaquillonas: a mayor cantidad de celos antes del primer servicio, mayor será la fertilidad en dicho servicio (Byerley et al., 1987).

En Uruguay, si bien la información es escasa, se estima que el 50% de las vaquillonas de carne son entoradas por primera vez a los 3 años de edad (Pereira, 2003). Esto es uno de los factores determinantes de la baja eficiencia reproductiva de los rodeos de cría, ya que más de 527 mil vaquillonas de más de 2 años se mantienen en el campo sin entorar (DIEA, 2017). Por su parte, en vaquillonas de leche la edad óptima al primer parto es de 24-25 meses con un peso vivo (PV) de 530 kg (Hoffman, 1997), para lo que la pubertad debería alcanzarse a una edad promedio de 10 meses con 275 kg y el primer entore a los 15 meses de edad con 350 kg. En contrapartida, durante años la edad al primer servicio y al primer parto en Uruguay se situaron en los 26,6 y 35,6 meses, respectivamente (Sotelo, 2017), lejos de los objetivos anteriormente mencionados. En los últimos 5 años y como consecuencia de una mayor intensificación de los sistemas de recría de vaquillonas, la cantidad de vaquillonas que pare por primera vez con menos de 30 meses de edad aumentó del 24% al 53% (Sotelo, 2017). Por lo tanto, en ambos sistemas, la recría de las hembras representa una de las principales limitantes para el crecimiento del sector en Uruguay.

Como se mencionó anteriormente, el correcto manejo de la recría implica lograr un adecuado crecimiento y desarrollo de los animales, que permita adelantar el comienzo de la pubertad y la edad al primer parto, y de esa manera incrementar la vida productiva de las hembras, tanto en sistemas de producción de carne (Larson, 2007) como de leche (Zanton & Heinrichs, 2005). El manejo de los factores ambientales que influyen sobre el desarrollo reproductivo es una de las posibles estrategias para lograr dichos objetivos. Los factores ambientales, entre ellos los factores sociales, influyen sobre el desarrollo y actúan como moduladores de la reproducción en los animales (DeVries, 2010).

Entre los factores sociales que influyen sobre diferentes aspectos del desarrollo de las vaquillonas se encuentran la bioestimulación (BE) y la dominancia social. Dependiendo del sistema de manejo que se realice, ambos factores influirán en mayor o menor medida sobre los resultados finales. En éste sentido, el objetivo de la presente tesis fue evaluar diferentes

aspectos de la BE y la dominancia social sobre el desarrollo reproductivo y corporal de vaquillonas de carne y de leche, respectivamente.

La BE puede definirse como el estímulo provocado por la presencia de los machos, induciendo el estro y la ovulación mediante estímulos genitales, feromonas u otras señales químicas (Chenoweth, 1983). La BE es efectiva para disminuir el anestro posparto en vacas (Berardinelli & Joshi, 2005; Berardinelli & Tauck, 2007; Landaeta-Hernández et al., 2008) y la edad a la pubertad en vaquillonas (Rekwot et al., 2000; Oliveira et al., 2009). En Uruguay, el 90% de los sistemas criadores se desarrollan en condiciones extensivas a campo natural (DIEA, 2017), lo que determina la necesidad de buscar medidas de manejo de bajo costo, y que tengan impacto medio a alto. En ese sentido, la BE es una alternativa de bajo costo y exenta de efectos adversos, cuyos efectos positivos sobre la edad a la pubertad ya han sido demostrados en nuestras condiciones (Ungerfeld, 2009; Fiol et al., 2010; Fiol & Ungerfeld, 2011). Sin embargo, a diferencia de los pequeños rumiantes, el mecanismo de respuesta que se desencadena en las hembras expuestas a los machos no está claramente determinado. La posibilidad de ampliar el conocimiento de cómo las hembras responden a la BE posibilitaría la aplicación de la misma en forma más controlada y maximizando los resultados positivos.

Los rumiantes son animales gregarios, que forman estructuras jerárquicas de dominancia y subordinación. La dominancia implica que exista un individuo dominante (ganador) y uno subordinado (perdedor), y “se refiere a la condición de un individuo con respecto a otro dentro del mismo grupo” (Drews, 1993). Desde el punto de vista evolutivo, la jerarquía social actuaría como un rasgo marcadamente adaptativo, permitiendo una mejor utilización de los recursos, con un mínimo de conflictos destructivos (Val-Laillet et al., 2008). Sin embargo, desde el punto de vista productivo puede ser una limitante al desempeño de muchos animales ya que determina una desigualdad de acceso a los recursos. Los sistemas intensivos de alimentación son utilizados con frecuencia en Uruguay durante la etapa de recría en vaquillonas de leche, ya que permiten un mayor control del proceso así como una relativa independencia de los factores climáticos (Conaprole, 2008). En dichos sistemas, cuando las condiciones de manejo no son las adecuadas (alta densidad animal, espacio de comedero inadecuado, lotes de animales desparejos, etc), la dominancia social puede repercutir negativamente sobre el desempeño productivo de las hembras. Sin embargo, de acuerdo a la bibliografía consultada no existen estudios en los que se evalúe las consecuencias de la dominancia social en condiciones de alta competencia sobre el desarrollo corporal y reproductivo de las vaquillonas.

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

La cría en los sistemas de producción de bovinos

La cría en las hembras es el período que transcurre desde el destete hasta la pubertad en vaquillonas de carne (Day & Anderson, 1998) o hasta el primer parto en vaquillonas de leche (Le Cozler et al., 2008). La posibilidad de adelantar la edad en que las vaquillonas tienen su primer parto es de gran importancia económica, ya que implica disminuir las categorías improductivas del predio y aumentar el número de terneros producidos en la vida del animal (Lesmeister et al., 1973; Tozer & Heinrichs, 2001). Tanto en los sistemas de producción de carne como de leche (Pirlo et al., 2000; Abeni et al., 2000) el objetivo debería ser lograr un primer parto a los 24 meses, de manera que el primer servicio debería realizarse a los 15 meses, con el PV y desarrollo corporal adecuados (Wathes et al., 2014; Diskin & Kenny, 2014). A su vez, con el objetivo de lograr una alta fertilidad es necesario que las vaquillonas se encuentren ciclando regularmente al inicio del servicio (Byerley et al., 1987). Por tanto, la edad a la pubertad adquiere especial relevancia en ambos sistemas de producción.

La pubertad se define como la culminación de una serie de eventos que finalizan en la ovulación, acompañada de manifestación de celo y función luteal normal (Day & Anderson, 1998; Perry, 2016). En vacas y ovejas, la pubertad se encuentra muchas veces precedida por ciclos irregulares, de corta duración, que pueden o no estar acompañados por celo u ovulación (Evans et al., 1994b). Los mecanismos fisiológicos vinculados al inicio de la pubertad están determinados por la maduración del hipotálamo y el inicio de la retroalimentación positiva sobre la pulsatilidad de la hormona luteinizante (LH), lo que determina el pico preovulatorio de LH y la ovulación (Day et al., 1984, 1986; Dodson et al., 1988; Evans et al., 1994a). Entre las 6 y 24 semanas de edad se produce un incremento pasajero en la secreción de LH, para luego comenzar a aumentar en forma progresiva durante los 40-80 días anteriores a la primera ovulación (Rawlings et al., 2003). Este incremento determina el crecimiento de los folículos antrales mayores, los que aumentan la secreción de estradiol (Rawlings et al., 2003). El aumento de la secreción de estradiol, junto a la disminución del número de receptores de dicha hormona a nivel hipotalámico, serían los principales determinantes de la disminución de la retroalimentación negativa del estradiol sobre la secreción de LH (Day et al., 1987; Rawlings et al., 2003).

Se encuentra ampliamente documentado que la edad y el PV, tanto el PV “estático” como el “dinámico”, son los principales factores que determinan la edad de la pubertad en vaquillonas (Arije & Wiltbank, 1971, 1974; Short & Bellows, 1971; Diskin & Kenny, 2014). En términos generales, las vaquillonas comienzan la actividad cíclica al alcanzar el 60-65% de su peso corporal adulto (Patterson et al., 1992). A su vez, el PV “dinámico”, o sea la tasa de ganancia antes y luego del destete, así como el PV al destete, se encuentran inversamente relacionadas con la edad a la pubertad de las vaquillonas (Ferrel, 1982; Granger et al., 1990). En general, cuando las ganancias de peso luego del destete son elevadas, el inicio de la actividad cíclica se encuentra más relacionado a la edad que al PV alcanzado por las vaquillonas (Greer et al., 1983; Yelich et al., 1995). Por lo tanto, cuanto mayor sea el peso al destete y la ganancia de peso posterior, la pubertad se logrará a menor edad y mayor PV (Greer et al., 1983).

En vaquillonas de carne de razas cruce británicas (Hereford y Aberdeen Angus), los estudios realizados en Uruguay indican que la pubertad se alcanza entre los 15-17 meses siempre que el PV se encuentre entre los 275-295 kg (Quintans et al., 2007; Guggeri et al., 2014). En las condiciones en que se realiza la cría vacuna en el país, la tasa de ganancia de peso a lo largo

de la recría de las vaquillonas, y fundamentalmente durante el segundo invierno de vida suele ser bajas para lograr un buen desarrollo de las vaquillonas, lo que determina un retraso en la edad a la pubertad y, en consecuencia, en la edad al primer servicio y parto (Quintans et al., 2004; Quintans et al., 2007). De acuerdo a los escasos datos disponibles, en Uruguay la mitad de las vaquillonas de carne se entoran por primera vez a los 24 meses y la otra mitad a los 36 meses de edad (DIEA, 2017). Por lo tanto, a excepción de los sistemas que presentan un mejor manejo de la alimentación durante la recría (i.e. alta proporción de mejoramientos de pasturas y/o uso de suplementación con concentrados energéticos), los productores presentan dificultades para alcanzar las metas de adelanto de la pubertad.

Por su parte, en las vaquillonas de raza Holando y Jersey, la pubertad ocurre cuando las vaquillonas llegan a los 280-360 y 330-390 días (Stewart et al., 1980), respectivamente, con un PV de 250-280 kg (Sejrnsen & Purup, 1997). En Uruguay, si bien son muy escasos los trabajos en que se evaluó el inicio de la ciclicidad en vaquillonas, la edad y el PV a la pubertad se encontrarían dentro de los rangos mencionados anteriormente (259-304 días con pesos de 253-280 kg; De Trinidad, 2014). La mayor parte de los productores lecheros mantienen sus vaquillonas en pasturas de baja calidad, lo que determina que durante la recría se alcancen bajas ganancias de PV, con el consiguiente retraso de la edad al primer parto (36 meses; Conaprole, 2008) en comparación con los 24 meses recomendados (Heinrichs & Swartz, 1990).

Los factores que influyen sobre el desarrollo de las vaquillonas, y especialmente sobre el inicio de la pubertad pueden ser agrupados en genéticos, nutricionales y ambientales.

Factores ambientales que influyen sobre la edad de la pubertad y el desarrollo en vaquillonas

Se entienden por factores ambientales a todos aquellos aspectos vinculados al entorno donde se encuentran las vaquillonas y al sistema de manejo de las mismas, los que han demostrado influir de diferente magnitud sobre el desarrollo corporal y reproductivo de los bovinos. Dentro de éstos se pueden mencionar a la temperatura (Alves et al., 2017), el fotoperíodo, el sistema de alojamiento (Pempek et al., 2016), el manejo de la alimentación (DeVries, 2010) y el ambiente social. En la actualidad, en la mayoría de los sistemas de producción las vaquillonas son mantenidas en grupos, lo que posibilita que los animales manifiesten su comportamiento social normal (Bøe & Fæverik, 2003). En éste sentido, el incremento del conocimiento sobre las posibles repercusiones del ambiente social permite la posibilidad de desarrollar estrategias de manejo que reduzcan los efectos negativos de la integración social y promuevan las ventajas de su manipulación.

Tanto en los sistemas de producción de carne del hemisferio norte como en los de Uruguay, la recría de vaquillonas para reemplazo del rodeo de cría se realiza en su mayor parte en condiciones extensivas a campo natural (DIEA, 2017). Las tecnologías basadas en tratamientos hormonales presentan buenos resultados para lograr una menor edad al primer entore, pero los efectos negativos derivados de su uso, tanto a nivel medio ambiental (disruptores ambientales) como del comercio de nuestros productos (posibles dificultades para el acceso a ciertos mercados) han ido en aumento (Scaramuzzi & Martin, 2008). En este contexto, la evaluación de los factores ambientales, específicamente la BE o efecto macho surge como una alternativa potencial de creciente interés, de bajo costo, fácil aplicación y sin consecuencias negativas. La BE puede definirse como el estímulo provocado por la presencia de los machos, induciendo el estro y la ovulación mediante estímulos genitales, feromonas u

otras señales químicas (Chenoweth, 1983). La BE es efectiva para disminuir el anestro posparto en vacas (Berardinelli & Joshi, 2005; Berardinelli & Tauck, 2007; Landaeta-Hernández et al., 2008) y la edad a la pubertad en vaquillonas (Rekwot et al., 2000; Oliveira et al., 2009). Nuestro equipo ha demostrado la potencialidad del uso de la BE como forma de adelantar el inicio de la actividad cíclica en vaquillonas de carne en condiciones extensivas de producción en Uruguay (Ungerfeld, 2009; Fiol et al., 2010; Fiol & Ungerfeld, 2011a; Fiol & Ungerfeld, 2012). Sin embargo, a diferencia de la amplia información que existe en pequeños rumiantes, el mecanismo de acción de la BE sobre la actividad cíclica de las hembras no está claramente demostrado en los bovinos. La posibilidad de ampliar el conocimiento de cómo las hembras responden a la BE posibilitaría la aplicación de la misma en forma más controlada y maximizando los resultados positivos.

En las últimas décadas ha existido un gran incremento de los estudios que evaluaron el impacto de diferentes sistemas de alojamiento y de manejo de la alimentación sobre el desarrollo de las vaquillonas de leche (DeVries, 2010; Heinrichs et al., 2017). La recría intensiva de hembras lecheras es un sistema en el que los animales no tienen acceso o tienen un acceso parcial a la pastura, en los que es frecuente que se suministre el alimento en forma de ración totalmente mezclada (RTM). Dicho manejo es una alternativa de creciente difusión ya que, entre otros beneficios, permite un mayor control del proceso y mayores ganancias de PV así como una relativa independencia de los factores climáticos (Conaprole, 2008). En los sistemas de recría intensiva, la competencia entre animales puede influir sobre el crecimiento y desarrollo de las hembras (De Vries, 2010; Crossley et al., 2017). Específicamente, cuando las condiciones de manejo no son las adecuadas (alta densidad animal, espacio de comedero inadecuado, lotes de animales desparejos, etc), la dominancia social puede repercutir negativamente sobre el desempeño productivo de las hembras (Chebel et al., 2016).

Los rumiantes son animales gregarios, que forman estructuras jerárquicas de dominancia y subordinación. La dominancia implica que exista un individuo dominante (ganador) y uno subordinado (perdedor), y “se refiere a la condición de un individuo con respecto a otro dentro del mismo grupo” (Drews, 1993). Desde el punto de vista evolutivo, la jerarquía social actuaría como un rasgo marcadamente adaptativo, permitiendo una mejor utilización de los recursos, con un mínimo de conflictos destructivos (Val-Laillet et al., 2008). Sin embargo, desde el punto de vista productivo puede ser una limitante al desempeño de muchos animales ya que determina una desigualdad de acceso a los recursos. Como fuera mencionado, la nutrición se encuentra altamente relacionada con la edad de la pubertad (Yelich et al., 1995, 1996; Chelikani et al., 2003; De Trinidad, 2014). Por lo tanto, es de esperar que cualquier alteración del nivel nutricional y/o del comportamiento ingestivo de las terneras y vaquillonas a lo largo de la recría, como son los provocados por la alta competencia y sus repercusiones sobre la dominancia social, determine cambios en el desarrollo corporal y por lo tanto afecte el perfil endócrino-metabólico y el desarrollo reproductivo. En este sentido, conocer el impacto de las relaciones de dominancia y subordinación entre las vaquillonas se vuelve esencial como forma de establecer su importancia y posibilitar la implementación de medidas que disminuyan sus posibles efectos negativos. Sin embargo, de acuerdo a la bibliografía consultada no existen estudios en los que se evalúe las consecuencias de la dominancia social en condiciones de alta competencia sobre el desarrollo corporal y reproductivo de las vaquillonas.

A continuación se discutirán los principales factores vinculados al mecanismo de acción de la BE y a la dominancia social, en vaquillonas de carne y leche, respectivamente.

Bioestimulación en bovinos

La bioestimulación o efecto macho o toro, se define como el estímulo provocado por la presencia de los machos, induciendo el estro y la ovulación mediante estímulos genitales, feromonas u otras señales químicas (Chenoweth, 1983). El efecto macho es efectivo para disminuir el anestro postparto en vacas de cría (Zalesky et al., 1984; Alberio et al., 1987; Berardinelli & Joshi, 2005). Sin embargo, la información acerca del uso del mismo para adelantar la pubertad en vaquillonas de carne es escasa. Varios factores influyen en la respuesta de las vaquillonas a la bioestimulación, entre los cuales el estado nutricional y de desarrollo de las vaquillonas al inicio de la exposición, y la tasa de ganancia de peso durante la misma serían los de mayor importancia. Una mayor cantidad de vaquillonas de 25,5 meses de edad comenzaron a ciclar luego de 50 días de exposición a toros en comparación con vaquillonas de 23,5 meses de edad (Quadros & Lobato, 2004). A su vez, en las vaquillonas más jóvenes al comienzo de la BE fue necesario un periodo de exposición más largo a los machos para obtener una respuesta positiva en el inicio de la ciclicidad (Roberson et al., 1991; Oliveira et al., 2009). Rekwot et al. (2000) reportaron que las vaquillonas criadas en grupos mixtos alcanzan la pubertad con edades menores y pesos vivos mayores que aquellas que se mantuvieron aisladas de los machos. Por su parte, Roberson et al. (1991) encontraron que las vaquillonas con mayor tasa de ganancia de peso durante la exposición a los machos comenzaron a ciclar antes que aquellas con tasa de ganancia media. Oliveira et al. (2009) obtuvieron efectos positivos de un largo periodo de exposición (210 días) sobre la actividad cíclica en vaquillonas prepuberales de 12 meses de edad, pero no de la suplementación de dichas hembras. Sin embargo, las vaquillonas expuestas a machos presentaron un mayor PV final, el que se correlacionó con una menor edad a la pubertad. El PV al inicio de la exposición a los machos afecta la respuesta de las vaquillonas a la bioestimulación, ya que en varios trabajos se encontraron efectos positivos solamente en las vaquillonas más pesadas (Quadros & Lobato, 2004; Fiol et al., 2010). A su vez, la proximidad física con los machos fue mayor en las vaquillonas más pesadas que en las más livianas (Fiol et al., 2010).

Con el objetivo de separar los efectos de la atractividad relacionada con el PV y de la competitividad entre hembras de diferentes pesos vivos, evaluamos el comportamiento sexual de novillos androgenizados (NA) hacia vaquillonas de PV alto o bajo en tests de competencia o en forma aislada cada hembra con el NA (Fiol & Ungerfeld, 2011). Los NA mostraron preferencia por las vaquillonas más pesadas únicamente cuando se encontraron en situaciones de competencia con vaquillonas más livianas, pero no existieron diferencias al encontrarse en forma aislada con cada una de las vaquillonas, independientemente de su PV. Por lo tanto, los factores asociados con la competencia entre hembras, y no el PV de las hembras en sí mismo, serían los determinantes del mayor estímulo recibido por las hembras más pesadas. A su vez, es importante considerar que el PV es uno de los principales factores determinantes del rango social en bovinos (Bouissou, 1972). En cabras, el rango social afecta la respuesta de la exposición a los machos: las hembras dominantes mantuvieron una mayor proximidad física con los machos, y más hembras tuvieron respuesta endócrina y ovárica a la bioestimulación (Alvarez et al., 2003, 2009). Es posible especular que al encontrarse hembras de diferentes pesos vivos juntas las relaciones de dominancia-subordinación serían determinantes de las diferentes respuestas de la exposición a los machos debido a la competencia entre dichas hembras por el acceso a los machos. En contraposición a lo expuesto, otros autores no encontraron efecto de la bioestimulación sobre la edad de la pubertad, tanto con periodos cortos (Berardinelli et al., 1978; Macmillan et al., 1979) como largos de exposición (Roberson et al., 1987).

Mecanismo de respuesta a la bioestimulación en bovinos

Los mecanismos fisiológicos que desencadenan la respuesta en las hembras se encuentran bien documentados en pequeños rumiantes. Las cabras y ovejas responden a la introducción de los machos con un rápido incremento en la secreción de LH (Martin et al., 1983; Ungerfeld, 2003), la que estimula el crecimiento folicular (Atkinson & Williamson, 1985; Delgadillo et al., 2009), seguido de la ovulación 2-3 días más tarde. En pequeños rumiantes, la primera respuesta de la exposición a los machos es un incremento en la frecuencia de pulsos de LH, que puede ser observada a los pocos minutos luego de introducir los machos (revisiones: Martin et al., 1986; Walkden-Brown et al., 1999; Ungerfeld, 2007). Este incremento también se observa en ovejas ovariectomizadas, lo que implica que el cambio de la retroalimentación negativa a positiva de los estrógenos no sería el único mecanismo involucrado en la respuesta (Martin et al., 1983). La ovulación ocurre aproximadamente a las 48 h luego de la exposición inicial a los machos, pero al menos en ovejas ésta ovulación no se encuentra asociada a comportamiento estral (Signoret, 1991), y en aproximadamente la mitad de las hembras resulta en un cuerpo lúteo (CL) subnormal que regresa luego de 6-7 días (Gelez & Fabre-Nys, 2006; Ungerfeld, 2003). El comportamiento estral se presenta a los 17-25 días luego de la introducción de los machos.

A diferencia de lo que sucede en pequeños rumiantes, los mecanismos fisiológicos involucrados en la respuesta a la BE en vacas no se encuentran descritos, y los estudios en que han sido evaluados se han desarrollado únicamente en vacas durante el posparto. Fernandez et al. (1996) reportaron que la exposición de vacas en forma continua o intermitente a toros epididictomizados desde los 30 días posparto genera un incremento en la concentración media y en la frecuencia de pulsos de LH. En vacas lecheras, Roelofs et al. (2007) encontraron que la exposición de vacas a machos a través de un alambrado por 8 h induce una mayor concentración media y basal de LH, y un incremento de los pulsos de LH. En forma similar, el tratamiento oronasal con orina de toros durante 7 días determinó un incremento de las concentraciones medias de LH en vacas lecheras durante el posparto (Baruah & Kanchev, 1993). En estudios más recientes, la exposición aguda a toros (5 h diarias durante 9 días; Tauck et al., 2010) de vacas primíparas lactando a partir de los 67 días posparto incrementó la frecuencia de pulsos de LH en comparación con las hembras expuestas a novillos, pero sin diferencias en la concentración media, basal ni en la amplitud o duración de los pulsos de LH entre tratamientos. A su vez, ninguno de los grupos de vacas reasumió la ciclicidad durante el experimento (Tauck et al., 2010). En contraste, Custer et al. (1990) no observaron cambios en el patrón de secreción de LH en vacas de carne primíparas expuestas a toros durante el posparto, a pesar de que la bioestimulación fue efectiva para reducir el intervalo al primer celo.

Una de las posibles explicaciones para estos resultados contradictorios podría ser el mayor tiempo necesario para el aumento de LH en vacas comparado con lo observado en pequeños rumiantes. En este sentido, se debe considerar que el muestreo sanguíneo podría influir sobre los resultados, y el mismo fue diferente entre experimentos: mientras que Custer et al. (1990) comenzaron el muestreo 10 días luego de la introducción de los machos, y lo realizaron en forma semanal, en los otros estudios la primera muestra de sangre fue tomada al momento de la introducción de los machos (Baruah & Kanchev, 1993; Fernandez et al., 1996), 1 día (Roelofs et al., 2007) o 1 h (Tauck, 2008; Tauck et al., 2010) antes de la introducción, y fue repetida diariamente (Tauck et al., 2010) o cada 3 días (Fernandez et al., 1996). Por lo tanto, las diferencias en la respuesta endócrina de las vacas a la exposición a los machos y en el

muestreo sanguíneo entre experimentos podrían explicar las discrepancias entre estudios en relación a la respuesta en LH.

En ovejas, la respuesta ovárica resultante de la introducción de los carneros se encuentra bien documentada (Atkinson & Williamson, 1985; Martin et al., 1986; Ungerfeld et al., 2002). También se han encontrado efectos positivos de la exposición a los machos sobre el diámetro folicular en vaquillonas prepúberes (Bastidas et al., 1997) y en vacas posparto (Berardinelli et al., 2009). Sin embargo, a diferencia de lo que sucede en pequeños rumiantes, en vacas la respuesta ovulatoria es más dispersa en el tiempo, lo que sería consecuencia de una mayor dispersión de los cambios endócrinos inducidos por los machos. Esto determinaría la dificultad en detectar cambios debido a los diferentes tiempos individuales en que ocurrirían. Bastidas et al. (1997) realizaron ecografías ováricas semanales en hembras expuestas y aisladas de machos. Si bien no encontraron diferencias en el inicio de la actividad cíclica, el número de folículos pequeños y grandes se incrementó luego de la exposición a los machos. Por su parte, Berardinelli et al. (2009) reportaron un menor intervalo entre ondas foliculares y un mayor tamaño del folículo dominante en las hembras expuestas a los machos en forma continua o cada 6 ó 12 h durante los primeros 45 días posparto.

Por lo tanto, si bien la información es escasa, la exposición a los machos induciría un incremento en la secreción de LH que se asociaría con una mayor tasa de crecimiento folicular. En síntesis, la mayor parte de la información indica que los efectos positivos de la bioestimulación en bovinos estarían mediados por la activación del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal, pero el momento en que se observa la respuesta diferiría de la observada en pequeños rumiantes.

Jerarquía social y dominancia en rumiantes

Los herbívoros son animales gregarios: la estructura social del grupo se basa en las relaciones entre los individuos, desde la cooperación hasta la competencia, mediante la organización de los mismos en base a jerarquías sociales (Bouissou, 1972). La jerarquía puede ser definida como un orden de rangos entre individuos, basado en mutuas relaciones de dominancia-subordinación (Val-Laillet et al., 2008). La dominancia implica que exista un individuo dominante (ganador) y uno subordinado (perdedor), y “se refiere a la condición de un individuo con respecto a otro dentro del mismo grupo” (Drews, 1993). Desde el punto de vista evolutivo, la jerarquía social actuaría como un rasgo marcadamente adaptativo, permitiendo una mejor utilización de los recursos, con un mínimo de conflictos destructivos (Val-Laillet et al., 2008). Sin embargo, desde el punto de vista productivo puede ser una limitante al desempeño de muchos animales. El establecimiento de jerarquías sociales es una parte integral del comportamiento animal presente en muchas especies. Durante el establecimiento de la jerarquía los encuentros entre individuos son mayormente físicos, siendo los ataques y las peleas los mecanismos más frecuentes. Si la composición grupal y el ambiente se mantienen estables, es de esperar que la jerarquía social en el grupo no se modifique en forma frecuente (Val-Laillet et al., 2008).

En grupos con dominancia ya establecida, la mera presencia de un animal dominante puede determinar actitudes de subordinación en los individuos de menor jerarquía (Craig, 1986). En vacas lecheras, Shein & Fohrman (1955; citado por Val-Laillet et al., 2008) fueron de los primeros investigadores en describir las relaciones de dominancia, estableciendo las clásicas propiedades de asimetría (un solo miembro del par inicia el comportamiento agresivo sin represalia del otro miembro) y transitividad (e.j. si $A > B$, y $B > C$, entonces $A > C$), que

resultan en una jerarquía lineal dentro del grupo. Sin embargo, posteriormente se determinó en varios estudios que en bovinos, especialmente al tratarse de grupos grandes, se dan diferencias en relación a las clásicas propiedades de la dominancia, observándose tanto dominancias bi-direccionales (ambos miembros del par inician el comportamiento agresivo) como intransitivas (Val-Laillet et al., 2008). Por lo tanto, se ha establecido que la jerarquía social en bovinos podría ser lineal, no lineal (con una o dos tríadas intransitivas), y hasta compleja (con múltiples tríadas intransitivas) (Craig, 1986).

Las relaciones de dominancia determinan un acceso desigual a recursos como alimento, áreas de descanso o sombra, además de individuos del otro sexo (Ingrand et al., 2001). Además de las consecuencias directas del acceso a recursos, la competencia genera situaciones de estrés crónico, especialmente para los animales que resultan subordinados. A su vez, el impacto de los factores sociales sobre los parámetros productivos es uno de los factores menos evaluados (Bach et al., 2008). Por ejemplo, se sabe que las vacas dominantes producen más leche que las subordinadas (Phillips & Rind, 2002; Val-Laillet et al., 2008). La información acerca de los efectos de la dominancia social sobre los aspectos productivos y reproductivos en vaquillonas es escasa, y será presentada a continuación.

Dominancia y producción en vaquillonas de razas lecheras

En vaquillonas de razas lecheras, el estudio de la interacción entre comportamiento y manejo nutricional durante el periodo prepuberal ha ido en aumento en los últimos años (DeVries, 2010). En varios estudios se ha demostrado que la jerarquía social altera el patrón de consumo de alimento (Olofsson, 1999; Gonzalez et al., 2008; Greter et al., 2010). La competencia por el alimento afecta el patrón de consumo de las vaquillonas (DeVries & von Keyserlingk, 2009a), lo que se evidencia más claramente en los sistemas semi-intensivos e intensivos de recría (a corral). En estos sistemas, existiría una alteración de la tasa de consumo en respuesta a la presión generada por la competencia a nivel del comedero. En general, los animales de rango social bajo son interrumpidos más frecuentemente durante el consumo de alimento, presentan periodos de consumo más cortos y mayor número de visitas al comedero que los animales de rango social alto (González et al., 2008a, 2008b). Al existir competencia entre individuos, el tiempo total de consumo disminuye, pero la tasa de consumo aumenta en los animales de bajo rango (DeVries & von Keyserlingk, 2009a). A su vez, las vaquillonas de rango social alto aumentan el tiempo total de consumo de alimento cuando el espacio de comedero se vuelve limitante (Olofsson, 1999). El método de distribución del alimento en los sistemas a corral también influye sobre el comportamiento ingestivo y el resultado productivo. La administración de la dieta en forma de RTM o con el agregado del concentrado o ración sobre el voluminoso, son los dos principales métodos de suministro del alimento en dichos sistemas. El consumo de RTM disminuye la tasa de consumo y la posibilidad de selección a favor de ciertos componentes de la dieta, así como la competencia a nivel del comedero, en comparación al suministro de la ración sobre el voluminoso (Greter et al., 2010), promoviendo el consumo de una dieta más balanceada (DeVries & von Keyserlingk, 2009b). A su vez, cuando la ración se ofreció por encima del voluminoso, Greter et al. (2010) hallaron una correlación positiva entre el estatus social y la tasa de ganancia de peso diaria: las vaquillonas dominantes tuvieron una mayor tasa de ganancia de peso en relación a las subordinadas. En síntesis, el incremento de la competencia determina mayores efectos de la dominancia social en vaquillonas, lo que redundaría en diferencias observables a nivel productivo entre vaquillonas dominantes y subordinadas.

La modificación del comportamiento a través del manejo de la alimentación podría afectar negativamente el bienestar animal, ya que además de afectar la cantidad de alimento consumido determinaría un aumento del estrés crónico sufrido por el animal (Bach et al., 2008). Schubach et al. (2017) reportaron que las vaquillonas mantenidas en grupos con mayor densidad animal (14 m²/vaquillona vs 25000 m²/vaquillona) tuvieron mayores niveles de estrés crónico y un retraso en el inicio de la pubertad en comparación con aquellas mantenidas a una menor densidad animal. El estrés puede ser definido como un estado biológico de disrupción de la homeostasis determinado por un estímulo, también llamado “estresor” (Selye, 1950; citado por Rault, 2012). En este sentido, las interacciones sociales pueden ser una causa de estrés para el animal, lo que es denominado “estrés psicosocial” (revisión: Chebel et al., 2016). El estrés afecta la reproducción en las hembras, inhibiendo la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y de la LH a nivel hipotalámico e hipofisario, respectivamente (Dobson et al., 2003). En rumiantes, los trabajos que vinculan jerarquía social y estrés son escasos, y no existe consistencia entre las especies. A su vez, existen diferentes parámetros para evaluar estrés en animales de producción, lo que influye en los resultados obtenidos. Por ejemplo, Mooring et al. (2006) reportaron que la concentración basal de glucocorticoides fecales es mayor en bisontes macho de alto rango jerárquico que en los de bajo rango. Sin embargo, Arave et al. (1977) concluyeron que la determinación de corticoides totales en sangre no era una buena medida para determinar estrés social en vacas, mientras que Partida et al. (2007) no encontraron diferencias en las concentraciones basales de corticoides fecales ni séricos entre toros Holando de rango social alto o bajo. Por lo tanto, en animales de producción el mantenimiento de la jerarquía social puede ser afectado por los diferentes manejos, lo que puede determinar aumentos de la agresividad y del estrés, con la posible alteración de los resultados reproductivos y productivos.

Crecimiento y regulación metabólica en vaquillonas

El crecimiento óptimo de una vaquillona lechera puede ser definido como aquel régimen que permita el desarrollo de la vaquillona hasta su máximo potencial de producción de leche a la edad deseada y con un mínimo costo (Heinrichs & Lammers, 2008). La evaluación del crecimiento se ve facilitada por la determinación de diferentes medidas corporales, especialmente las relaciones entre el PV, la altura a la cruz, la circunferencia torácica, la longitud del cuerpo y el ancho de la cadera (Heinrichs et al., 1992). El aumento del PV sin el correspondiente desarrollo esquelético puede determinar un desarrollo inadecuado de la glándula mamaria y una menor producción de leche, por lo que además del PV, resulta esencial determinar los parámetros de crecimiento esquelético. A su vez, la deposición de grasa corporal ha demostrado ser un mejor predictor de alteraciones en el desarrollo de la glándula mamaria que la ganancia de peso corporal (Silva et al., 2002). La condición corporal (CC) representa una medida de la deposición grasa del animal, para lo que existe una escala diseñada para vaquillonas lecheras (Heinrichs & Lammers, 2008). Según Heinrichs et al. (1992), la altura a la cruz y el ancho de cadera serían los parámetros más adecuados ya que no se encuentran afectados por la CC del animal. En este sentido, el estado fisiológico de la hembra, en especial en relación a la edad de la pubertad, sería un regulador mayor del desarrollo mamario (Meyer et al., 2006). Desde los 3 meses de edad hasta la pubertad, el crecimiento de la glándula mamaria es proporcionalmente mayor que el crecimiento corporal del animal (periodo de crecimiento alométrico), lo que se encuentra asociado especialmente al incremento de la deposición de tejido adiposo. La alteración del crecimiento mamario en esta etapa afecta el potencial de producción de leche futuro. Incrementos importantes del nivel alimenticio antes de la madurez afectan la secreción de hormonas del complejo

lactogénico y reducen el crecimiento del parénquima mamario (Sejrsen, 1994). Por lo tanto, el correcto desarrollo corporal y mamario, y por consiguiente el futuro productivo del animal, se encuentran altamente influenciados por el manejo durante el periodo prepuberal.

El crecimiento y la función reproductiva de las vaquillonas se encuentran influenciados por el eje somatotrófico, que está integrado por la GHRH (hormona liberadora de la hormona de crecimiento) secretada por el hipotálamo, la GH (hormona de crecimiento o somatotropina) y el IGF-1 (factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1) (Taylor et al., 2004). La GH es secretada por la hipófisis anterior, y la unión con sus receptores, localizados fundamentalmente a nivel del hígado, desencadena la síntesis y secreción del IGF-1, el que a su vez ejerce una retroalimentación negativa sobre la hipófisis y el hipotálamo inhibiendo la secreción de GH (Roche et al., 2009). En las vacas, los receptores de IGF-1 también se expresan en múltiples estructuras relacionadas al crecimiento y la reproducción (Velazquez et al., 2008). A nivel del metabolismo del tejido adiposo, la GH estimula la lipólisis y atenúa la respuesta lipogénica a la insulina, a la vez que el IGF-1 ejerce un efecto positivo sobre la lipogénesis (Roche et al., 2009). Se ha demostrado que el IGF-1 tiene efectos sobre el desarrollo y la función reproductiva en vaquillonas: los niveles altos de IGF-1 actúan como una señal metabólica que indica el estatus nutricional al hipotálamo, con lo que se estimula la secreción de gonadotropinas (Velazquez et al., 2008).

A su vez, existen mecanismos de retroalimentación complejos entre el eje somatotrófico y algunas hormonas y metabolitos, principalmente insulina y glucosa, que influyen sobre el crecimiento y la reproducción. La insulina es un potente regulador de la lipogénesis (Roche et al., 2009), mediador de los efectos de la nutrición sobre la dinámica folicular y se ha reportado su rol como facilitador de la secreción de IGF-1 en el hígado (Webb et al., 2004). La glucosa es la principal fuente de energía para la función ovárica (Brickell et al., 2009), y es uno de los principales sustratos metabólicos necesarios para una correcta función reproductiva (Hess et al., 2005). En este sentido, sus efectos son más permisivos que causales: las concentraciones de glucosa menores a un cierto “umbral” son detectados a nivel del hipotálamo, determinando una disminución de la secreción de la GnRH (Hess et al., 2005). A su vez, tanto la insulina como el IGF-1 ejercerían efectos directos sobre la proliferación celular folicular y la esteroidogénesis *in vitro* (Armstrong et al., 2002), y su incremento se asocia positivamente con el hecho de ovular o no y con el crecimiento folicular *in vivo* (Webb et al., 2004). Por lo tanto, el IGF-1, la insulina y la glucosa son importantes mediadores de la función reproductiva en bovinos.

El incremento prepuberal de las concentraciones de IGF-1 actúa como modulador del inicio de la pubertad (Yelich et al., 1995, 1996). En este sentido, el incremento de la concentración de IGF-1 e insulina se asocia positivamente con una menor edad al primer celo en vaquillonas (Brickell et al., 2009). Las altas concentraciones de insulina e IGF-1 se asocian con incrementos en la secreción pulsátil de LH (McCann & Hansel, 1986). En contraposición, las bajas concentraciones de IGF-1 determinarían un retardo en la edad de la pubertad debido a la disminución de la síntesis de estradiol a nivel ovárico que impedirían el estímulo necesario para que se produzca el pico preovulatorio de LH (Velázquez et al., 2008). Por su parte, el incremento de la secreción de insulina actúa en forma directa, o indirectamente a través de la captación de glucosa por las células, alterando diferentes procesos involucrados en el inicio de la ciclicidad (Marston et al., 1995; Ciccioli et al., 2005). En este sentido, serían necesarias niveles de glucosa adecuados para que la insulina presente algún efecto sobre las concentraciones de LH (Lents et al., 2013).

El nivel nutricional durante el periodo prepuberal afecta la secreción de hormonas metabólicas y de algunos metabolitos: la tasa de ganancia de PV alta se asocia positivamente con una menor edad a la pubertad y con un incremento de las concentraciones de IGF-1, glucosa e insulina (Barash et al., 1994; Chelikani et al., 2009). En este sentido, otros metabolitos sanguíneos como el colesterol y la urea, pueden ser utilizados como indicadores del estatus nutricional y metabólico en bovinos. El colesterol es utilizado como una fuente de energía en rumiantes, y su incremento en sangre se asocia con un mejor estado nutricional de los animales (Cavestany et al., 2009). Los niveles de urea en suero y plasma se encuentran relacionados con la cantidad y degradabilidad ruminal de la proteína de la dieta, con la severidad del balance energético negativo en los animales, y con la relación existente entre el consumo de proteína y el balance energético del animal (Sartori & Mendes Guardieiro, 2010). A su vez, los altos niveles de urea en sangre podrían ser indicadores de un incremento en el catabolismo proteico generado como respuesta a un estado de estrés, como ocurre por ejemplo luego del transporte o el padecimiento de alguna enfermedad (Montgomery et al., 2009).

En síntesis, es de esperar que cualquier cambio relacionado con el consumo de alimento, la tasa de ganancia de PV y el estrés determinen alteraciones de las concentraciones de las hormonas y metabolitos mencionados que actúan como señales del desarrollo y el estatus nutricional para la función reproductiva. En éste sentido, los factores sociales, como ser la dominancia social, influyen sobre la respuesta a condiciones restrictivas en diferentes especies. A nivel internacional, no existen estudios que evalúen tanto las consecuencias fisiológicas como metabólicas de la dominancia social en situaciones de alta competencia en vaquillonas de razas lecheras.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El periodo de recría de las hembras es una etapa de gran relevancia para el futuro productivo y reproductivo, tanto en bovinos de carne como de leche. En ambos sistemas, un objetivo central durante dicha etapa es disminuir la edad al primer entore y lograr un buen desarrollo corporal de las vaquillonas al entore y primer parto (Wathes et al., 2014; Diskin & Kenny, 2014). Para ello es necesario que las vaquillonas se encuentran ciclando regularmente al inicio de los servicios, por lo que la edad a la pubertad adquiere gran relevancia. De acuerdo al sistema de manejo que se utilice, los factores sociales pueden influir en mayor o menor medida sobre la pubertad y el desarrollo de las vaquillonas durante la recría.

El 90% de los sistemas criadores en Uruguay se desarrollan en condiciones extensivas, en base a campo natural (DIEA, 2017), lo que determina que muchas veces las tasas de ganancia de peso a lo largo de la recría no sean suficientes para lograr un buen desarrollo de las vaquillonas. Como consecuencia, se retrasa la edad de la pubertad y del primer servicio y parto (Quintans et al., 2007), entorándose aproximadamente la mitad de las vaquillonas por primera vez a los 24 meses y la otra mitad a los 36 meses de edad (DIEA, 2017). En dichos sistemas se buscan incorporar medidas de manejo de bajo costo que tengan mediano a alto impacto, por lo que considerando que la utilización de la BE es eficaz para disminuir la edad a la pubertad en vaquillonas (Oliveira et al., 2009; Fiol et al., 2010; Fiol & Ungerfeld, 2012) la misma es una herramienta de potencial uso en cualquier sistema criador del país. Sin embargo, el mecanismo de respuesta de las vacas a la BE no está claramente determinado. La posibilidad de ampliar el conocimiento sobre cómo las hembras bovinas responden a la BE posibilitaría la aplicación de la misma en forma más controlada y maximizando los resultados positivos.

Por su parte, en Uruguay los sistemas intensivos de alimentación que incluyen RTM sin uso de pasturas o con uso parcial de las mismas, son utilizados con frecuencia durante la etapa de recría en vaquillonas de leche, ya que permiten un mayor control del proceso así como una menor dependencia de los factores climáticos (Conaprole, 2008). Cuando las condiciones de manejo no son las adecuadas (alta densidad animal, espacio de comedero inadecuado, lotes de animales desparejos, etc), la dominancia social puede repercutir negativamente sobre el desempeño productivo de las hembras (Manteca, 2009; Val-Laillet et al., 2008). Los mayores niveles de competencia a nivel del comedero determinan mayor variabilidad en las ganancias diarias de peso (GDP; Longenbach et al., 1999; González et al., 2008a), y mayores pesos vivos finales en las hembras de altos rangos jerárquicos que en las de bajo rango jerárquico (Greter et al., 2010). Es de esperar que cualquier alteración del nivel nutricional de las vaquillonas, como las provocadas por la alta competencia y la dominancia social, determine cambios en el desarrollo reproductivo y corporal de las vaquillonas. Los cambios a nivel reproductivo y corporal estarían determinados por alteraciones en el comportamiento ingestivo, en el consumo de alimento, y/o en los niveles de estrés social. Sin embargo, de acuerdo a la bibliografía consultada no existen estudios en los que se evalúen los efectos de la dominancia social en condiciones de alta competencia sobre el desarrollo corporal y reproductivo de las vaquillonas.

HIPÓTESIS

El entorno social en el que se encuentran las vaquillonas, tanto de carne como de leche, influye sobre su desarrollo.

La exposición de vaquillonas de carne en anestro a NA determina un incremento de la secreción de LH y del desarrollo folicular, adelantando el inicio de la ciclicidad.

Las vaquillonas dominantes presentan una menor edad a la pubertad, una mayor tasa de crecimiento corporal, mayor consumo de alimento y diferencias en el comportamiento ingestivo en relación a las subordinadas cuando se las mantiene en condiciones de competencia.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar si la bioestimulación y la posición social afectan el desarrollo durante el periodo prepuberal de las vaquillonas de carne y de leche, respectivamente.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar los cambios en el patrón de secreción de LH y el crecimiento folicular en vaquillonas de carne en anestro durante los primeros 30 días de exposición a NA.
2. Determinar si la exposición de vaquillonas de carne en anestro a NA durante 80 días adelanta el inicio de la actividad cíclica.
3. Comparar el desarrollo corporal y reproductivo y el estatus metabólico de vaquillonas de leche prepuberales dominantes y subordinadas mantenidas en condiciones de competencia (díadas) durante 120 días.
4. Comparar el CMS individual, el comportamiento ingestivo y algunos indicadores de estrés social en vaquillonas de leche prepuberales dominantes y subordinadas mantenidas en condiciones de competencia (díadas) durante 120 días.

ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

Procedimientos experimentales

Para alcanzar los objetivos mencionados se planteó la realización de dos experimentos (Experimento I y Experimento II). En ambos casos el manejo de los animales y los protocolos experimentales fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay).

Objetivos específicos 1 y 2: EXPERIMENTO I

El Experimento I fue diseñado para responder los objetivos específicos 1 y 2. Se realizó en el Campo Experimental N°1 de Facultad de Veterinaria, localizado en Migueles, Departamento de Canelones, entre los meses de julio y noviembre del 2009. Los resultados de dicho experimento fueron presentados en el siguiente artículo que se presenta como Publicación I.

Fiol C, Ungerfeld R. (2016). “Positive effects of biostimulation on luteinizing hormone concentration and follicular development in anestrus beef heifers”. *J Anim Sci* 94: 971-977.

Objetivos específicos 3 y 4: EXPERIMENTO II

Para cumplir con los objetivos específicos 3 y 4 se realizó el Experimento II en el Campo Experimental N°2 de Facultad de Veterinaria, localizado en Libertad, Departamento de San José, durante el periodo comprendido entre junio del 2013 y marzo del 2014. Los resultados correspondientes al objetivo específico 3 fueron publicados en el siguiente artículo, el que se presenta como Publicación II.

Fiol C, Carriquiry M, Ungerfeld R. (2017). “Social dominance in prepubertal dairy heifers allocated in continuous competitive dyads: Effects on body growth, metabolic status, and reproductive development”. *J Dairy Sci* 100: 2351-2359.

Los resultados correspondientes al objetivo específico 4 fueron publicados en el siguiente artículo, el que se presenta como Publicación III.

Fiol C, Aguerre M, Carriquiry M, Ungerfeld R. (2019). “Social dominance affects intake rate and behavioral time budget in pre-pubertal dairy heifers allocated in continuous competitive situations”. *Animal* 13:6, 1297-1303.

EXPERIMENTO I (Publicación I)

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 29 vaquillonas Hereford en anestro ($20,2 \pm 4,1$ meses edad; $257,5 \pm 32,5$ kg de PV) y seis NA. Las vaquillonas fueron adjudicadas a 2 grupos homogéneos en edad y PV: 1) vaquillonas expuestas a NA (grupo expuesto, GE; $n = 15$), y 2) vaquillonas control, que se mantuvieron aisladas de los NA y de cualquier otro macho durante toda la duración del estudio (grupo control, GC; $n = 14$). Todos los animales pastorearon un campo natural en dos potreros separados por más de 1000 m de manera que el GC no podría ver, oler ni escuchar a los machos, y todos recibieron suplementación con fardo de moha. Los novillos recibieron dosis semanales de propionato de testosterona desde el Día -7 al Día 14 (Día 0 = separación de los grupos e inicio de la exposición a los machos en el GE), momento en que fueron removidos y reemplazados por otros tres novillos igualmente tratados desde el Día 7 hasta el final del estudio (Día 80).

En los días -10, 1, 10, 20, y 30, en 8 vaquillonas por grupo, se extrajeron muestras de sangre cada 15 min durante 6 h para la determinación de las concentraciones de LH. Para caracterizar el patrón de secreción de LH de cada vaquillona, se definieron 4 variables: LH media, LH basal, frecuencia de pulsos de LH (pulsos/6 h) y amplitud de pulsos de LH. En relación al desarrollo folicular, se determinó el diámetro folicular máximo (DFM) y la presencia de CL mediante ultrasonografía ovárica diaria desde el Día -10 al Día 30. Durante el mismo periodo se registró el celo en todas las vaquillonas dos veces por día. La emergencia de una onda folicular fue definida en forma retrospectiva como el primer día en que se observó el folículo dominante de la misma (3-4 mm de diámetro). A su vez, se determinaron las siguientes variables en cada onda folicular: DFM, días para alcanzar el DFM, días hasta la regresión de la onda, y se calculó la tasa de crecimiento folicular. Se realizaron ultrasonografías semanalmente desde el Día 32 al 60, y los Días 70 y 80 para determinar la presencia de CL.

RESULTADOS

Luego de 10 días de exposición a los machos, las concentraciones medias y basales de LH (medias: 1,67 vs. 0,88 ng/mL [SEM 0,09]; basales: 1,53 vs. 0,74 ng/mL [SEM 0,09]), fueron mayores ($P < 0,05$) en el GE que en el GC (Figura 1).

El DFM fue mayor en las vaquillonas GE que en las GC ($P = 0,05$; $8,00 \pm 0,16$ vs. $7,52 \pm 0,17$ mm, respectivamente), pero ninguno de dichos folículos ovularon durante los primeros 40 días. El DFM de la segunda onda folicular fue mayor en el GE que en el GC, en coincidencia con el incremento transitorio de las concentraciones de LH (Cuadro I).

La proporción acumulada de vaquillonas cíclicas fue mayor en el GE que en el GC al día 60 (33,3 vs. 0%; $P = 0,01$), 70 (47 vs. 0%; $P < 0,005$), y 80 (53 vs. 0%; $P < 0,001$) del periodo de exposición.

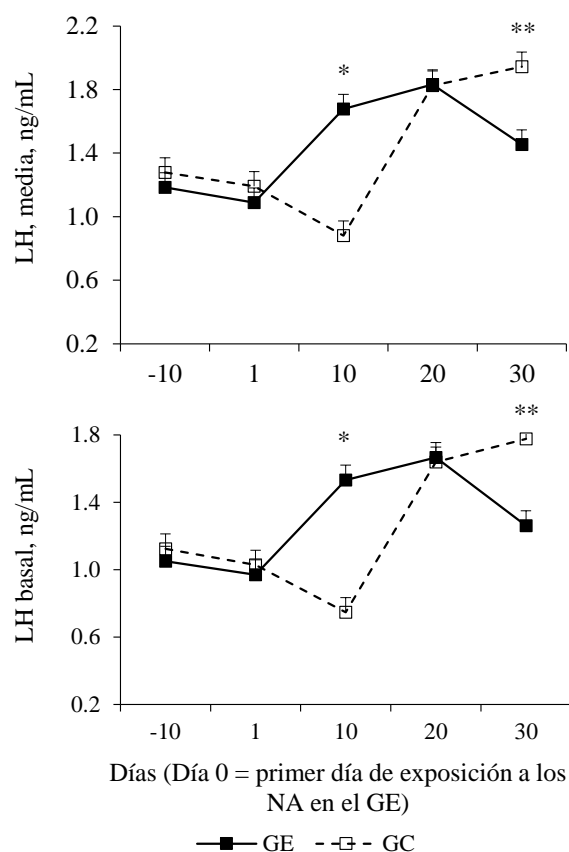


Figura 1. Concentración media (media \pm EEM) (panel superior) y basal (panel inferior) de LH en las vaquillonas expuestas (GE; $n = 8$) y aisladas (GC; $n = 8$) de novillos androgenizados (NA) durante 80 días. Los días en que existieron diferencias en las concentraciones medias y basales de LH se indican con * ($P < 0,001$) y ** ($P \leq 0,05$).

Cuadro I. Desarrollo folicular en las vaquillonas expuestas (GE) y aisladas (GC) de novillos androgenizados durante 80 días.

Variable	GC			GE			P		
	OF1	OF2	EEM	OF1	OF2	EEM	G	OF	G*OF
DFM, mm ²	7,3 ^a	7,7 ^a	0,20	7,5 ^a	8,5 ^b	0,19	0,05	<0,01	<0,05
D DFM ³	8,7 ^{ab}	7,3 ^b	0,47	8,5 ^{ab}	9,1 ^a	0,46	0,1	ns	<0,05
D REG ⁴	10,6	11,1	0,53	11,0	12,5	0,52	0,1	<0,05	ns
TCF, mm/d ⁵	0,86	1,09	0,05	0,92	0,96	0,05	ns	<0,05	ns

¹Cada variable es presentada para la primera (OF1) y segunda (OF2) onda folicular determinadas mediante ultrasonografía ovárica transrectal diaria durante los primeros 30 días de exposición a los machos.

²Diámetro folicular máximo.

³Días para alcanzar el DFM: período entre la emergencia de la onda y el primer día en que se detectó la finalización del crecimiento progresivo del diámetro folicular.

⁴Días a la regresión de la OF: último día en que se detectó la finalización de la disminución del diámetro folicular.

⁵Tasa de crecimiento folicular: crecimiento diario del diámetro folicular entre la primera aparición (3-4 mm) hasta el día de detección del diámetro máximo.

^{a-b} En cada fila, medias con diferentes letras difieren entre sí ($P \leq 0,05$). ns: diferencias no significativas.

EXPERIMENTO II (Publicaciones II y III)

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 12 terneras Holando y 4 Jersey x Holando, prepuberales ($250,8 \pm 9,8$ días; $208,5 \pm 13,9$ kg PV) manejadas en el mismo campo de forma similar antes del inicio del experimento. Las terneras se distribuyeron en 8 díadas homogéneas de acuerdo a la raza, edad y PV. Cada díada se alojó durante 120 días (Día 0 = comienzo de las mediciones) en un corral con sombra, separados por alambrados eléctricos del corral contiguo, dejando un pasillo para evitar todo contacto físico entre animales de diferentes díadas. Las vaquillonas se alimentaron con una RTM compuesta por maíz, harina de soja, silo de maíz o de pastura y una pre-mezcla comercial, con una relación 60:40 de forraje:concentrado, formulada para obtener una ganancia diaria de peso de 800 g/d (Cuadro II).

Cuadro II. Ingredientes y composición de nutrientes de las dietas

Ingrediente	Períodos ¹	
	I (Días 1 – 46)	II y III (Días 47 – 120)
Silo de maíz, %	58,3	-
Silo de pastura, %	-	59,3
Grano de maíz molido, %	28	32
Harina de soja, %	12,6	7,6
Urea, %	0,5	0,5
Premezcla comercial ² , %	0,5	0,5
<i>Composición química</i>		
MS, %	$30,3 \pm 1,3$	$60,2 \pm 2,9$
Cenizas, %	$7,0 \pm 0,2$	$12,2 \pm 0,3$
PC, %	$15,8 \pm 0,6$	$14,8 \pm 1,7$
FAD, %	$27,4 \pm 2,8$	$19,4 \pm 0,5$
FND, %	$50,7 \pm 4,6$	$31,9 \pm 1,0$
EE, %	$2,6 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,4$
EM ³ , Mcal/kg	2,37	2,46
PC/EM, g/Mcal	66,7	60,2

¹ Período I, II, y III corresponden a los Días 17-26, 78-87 y 112-120 del experimento..

² Cada 100 g: 0,8 g Rumensin®, 20 g Carbonato de calcio, 5 g Premezcla de vitaminas y minerales, 7 g óxido de Mg, 36 g bicarbonato de Na, 2 g Procreatin 7®, 5 g sal, 3 g Safmannan®, 21,2 g Semitin.

³ Estimada de acuerdo al NRC, 2001.

Los animales tuvieron un periodo de adaptación de 20 días (total del experimento = 140 días), durante el que fueron alojadas en las díadas y acostumbradas al manejo experimental. A su vez, durante dicho periodo se determinó el consumo de materia seca (CMS) potencial de cada díada mediante el pesaje de la RTM ofrecida y rechazada diariamente. El CMS potencial fue considerado cuando se alcanzó <3% de rechazo de la TMR durante al menos 3 días consecutivos. Posteriormente, para maximizar la competencia entre las vaquillonas en base a dicho CMS potencial, se restringió un 5% la cantidad de RTM ofrecida a cada díada. La cantidad de RTM ofrecida se ajustó luego de cada pesada de las vaquillonas considerando el

PV promedio de la díada. Cada díada tuvo acceso a un solo comedero (60 cm de frente-longitud) y a 2 bebederos durante todo el estudio, ofreciéndose el agua a voluntad.

La vaquillona dominante (DOM) y subordinada (SUB) fue determinada a través de la observación de las interacciones agonistas de cada díada, durante 15 min al momento de la administración de la RTM el Día 0 (luego del periodo de adaptación), dos veces más a lo largo del primer mes del estudio, y posteriormente en forma mensual.

Se registró el PV, la CC, la circunferencia torácica, la altura a la cruz y el espesor de grasa subcutánea de todas las vaquillonas cada 20 días. Desde el Día 0 se realizaron ecografías semanales a todas las vaquillonas, registrándose el DFM, el número de folículos >6 mm, y la presencia o no de un CL. El inicio de la pubertad fue considerado como el primer día de dos ecografías sucesivas (separadas 7 días) en las que se registró un cuerpo lúteo en el mismo ovario. Se extrajeron muestras de sangre de todas las vaquillonas cada 20 días para la determinación de las concentraciones de insulina, IGF-1, glucosa, colesterol y urea.

Se registró el patrón de actividades de cada vaquillona mediante la observación directa usando scan-sampling en 7 días (Días 1, 21, 35, 60, 75, 100 y 121) a lo largo del experimento. El registro fue realizado cada 10 min durante 12 h (total = 73 registros/día), desde las 0730-0830 (suministro de la RTM) hasta las 1930-2030 h. El horario fue ajustado a lo largo del estudio de acuerdo a la salida y puesta del sol. Luego de analizar el patrón de comportamiento en las 12 h de registro (media para cada periodo), se calculó la frecuencia de observaciones para las primeras 5 y últimas 6 horas de cada día, con el objetivo de agrupar las observaciones de acuerdo a los momentos de máxima y mínima competencia por el alimento. A su vez, para cada vaquillona se calculó el porcentaje de actividades a lo largo de las 12 h (hora 0 = suministro de la RTM) del día de registro (media de cada observación en cada periodo). Por su parte, el CMS fue estimado mediante la técnica del doble marcador (Maeda et al., 2011) en tres periodos diferentes a lo largo del experimento (Período I = Días 17-26; Período II = Días 78-87 y Período III = Días 112-121). La estimación de la excreción fecal y de la digestibilidad de la MS fue determinada mediante la utilización del óxido de cromo, como marcador externo, y de la fibra neutro detergente indigestible, como marcador interno, respectivamente. La tasa de consumo fue calculada como el CMS/tiempo comiendo por día.

RESULTADOS

Las vaquillonas DOM tuvieron mayor PV y GDP que las SUB, sin que existieran diferencias en ninguno de los otros parámetros de desarrollo corporal evaluados (Cuadro III). En relación al desarrollo reproductivo, existió una interacción entre grupo y tiempo en la cantidad de folículos totales: las vaquillonas DOM presentaron mayor número de folículos que las SUB los Días 30, 37, y 53 (Figura 2). A su vez, el DFM a lo largo del estudio fue mayor en las DOM que en las SUB (10,0 mm vs 9,0 mm; EEM = 0,3; P = 0,05). Las vaquillonas DOM alcanzaron antes la pubertad que las SUB (313,9 ± 4,9 días vs. 329,6 ± 5,7 días; P = 0,01), pero con similar PV (279,4 ± 2,6 kg vs. 277,4 ± 5,8 kg).

Cuadro III. Parámetros de desarrollo corporal en vaquillonas dominantes (DOM; n = 8) y subordinadas (SUB; n = 8) mantenidas en condiciones de competencia durante 120 días.

Item ¹	Grupo			P		
	DOM	SUB	EEM	Gr	T	Gr x T
PV, kg	269,3	265,3	1,50	0,04	<0,05	0,4
GDP, kg/d	0,858	0,770	0,02	0,03	<0,05	0,5
CC	3,02	3,06	0,04	0,2	<0,05	0,08
CT, cm	152,5	152,2	0,80	0,7	<0,05	0,1
Altura a la cruz, cm	112,6	112,6	2,00	0,9	<0,05	0,6
EGS, mm	0,75	0,74	0,06	0,5	<0,05	0,9

¹ PV: peso vivo; GDP: ganancias diarias de peso vivo; CC: condición corporal; CT: circunferencia torácica; EGS: espesor de grasa subcutánea.

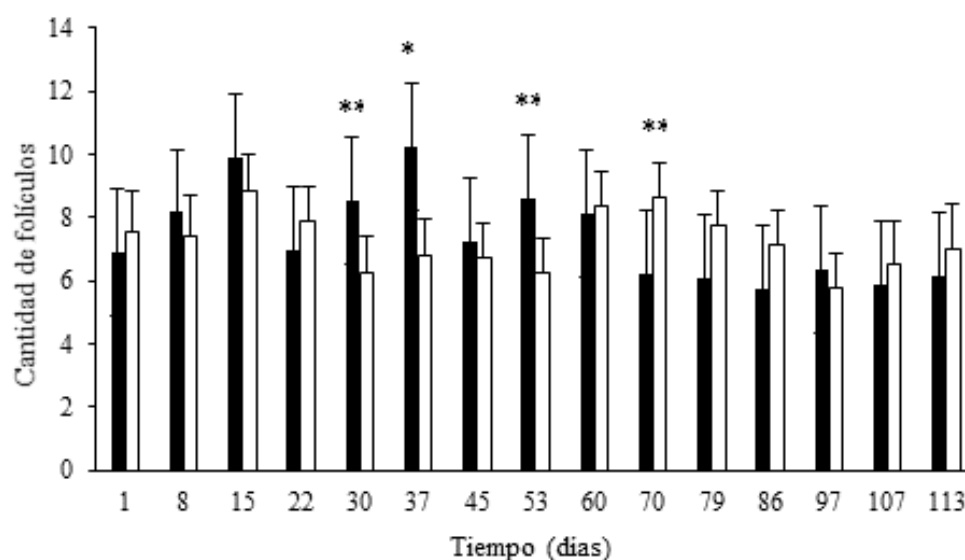


Figura 2. Cantidad de folículos ováricos en vaquillonas dominantes (barras negras) y subordinadas (barras blancas) mantenidas en condiciones de competencia durante 120 días. Diferencias significativas entre grupos para cada día se indican con * ($P \leq 0,05$) y ** ($0,05 < P \leq 0,10$).

Las concentraciones de glucosa también fueron mayores en las vaquillonas DOM que en las SUB ($89,2 \text{ mg/dL}$ vs. $86,8 \pm 1,2 \text{ mg/dL}$), pero a la inversa, las concentraciones de colesterol fueron mayores en las SUB que en las DOM ($86,1 \text{ mg/dL}$ vs. $90,2 \pm 2,6 \text{ mg/dL}$) (Figura 3). No existieron diferencias en las concentraciones del resto de las hormonas y metabolitos sanguíneos evaluados entre las vaquillonas de ambos rangos sociales (Cuadro IV).

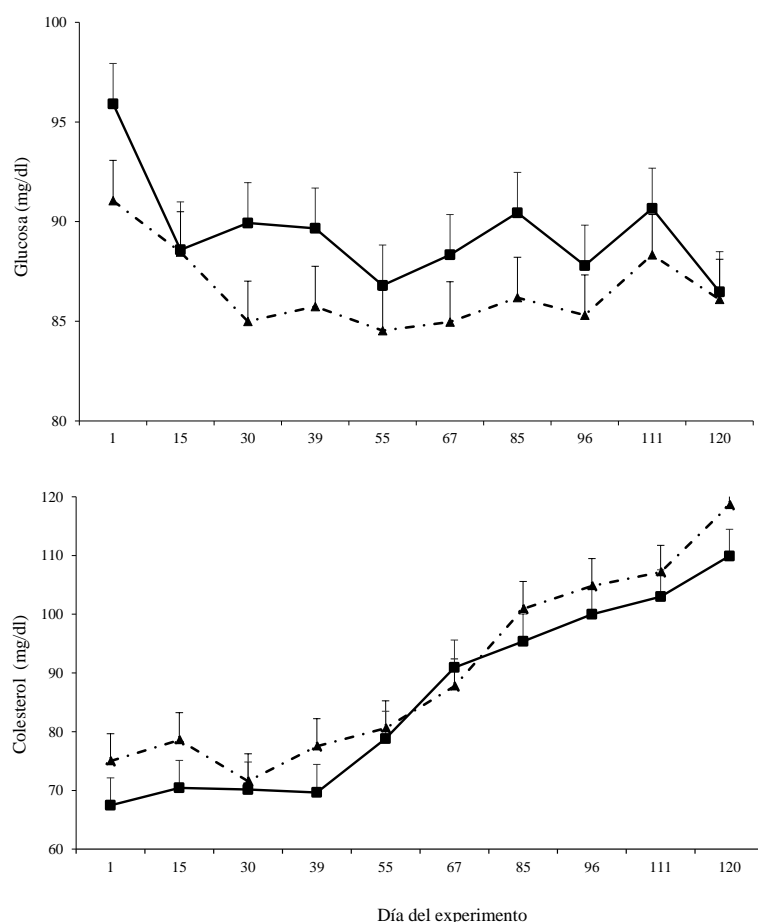


Figura 3. Concentración de glucosa (panel superior) y colesterol (panel inferior) en vaquillonas dominantes (n = 8; línea continua) y subordinadas (n = 8; línea punteada) mantenidas en condiciones de competencia durante 120 días.

Cuadro IV. Concentración de hormonas y metabolitos sanguíneos en vaquillonas dominantes (DOM; n = 8) y subordinadas (SUB; n = 8) mantenidas en condiciones de competencia durante 120 días.

Item	Grupo			P		
	DOM	SUB	EEM	Gr	T	Gr x T
Insulina, uIU/ml	22,4	21,3	1,50	0,6	< 0,05	0,1
IGF-I, ng/ml	364,3	371,7	12,7	0,7	< 0,05	0,9
Glucosa, mg/dl	89,2	86,8	1,20	0,01	< 0,05	0,3
Colesterol, mg/dl	86,1	90,2	2,60	0,02	< 0,05	0,6
Urea, mg/dl	23,3	22,4	0,70	0,4	< 0,05	0,8

Las vaquillonas DOM tendieron a comer durante más tiempo y estuvieron más tiempo rumiando y echadas que las SUB durante las primeras 5 h posteriores a recibir la RTM. En contrapartida, las SUB estuvieron más tiempo paradas durante las primeras 5 h que las DOM (Cuadro V). A su vez, existió una interacción grupo × periodo en las actividades de rumia y descanso (Figura 4). En las últimas 6 h de muestreo de comportamiento las vaquillonas DOM

tendieron a estar más tiempo rumiando y paradas que las SUB (Cuadro VI). Al analizar el patrón de comportamiento a lo largo de las 12 h de muestreo, existió una interacción grupo × tiempo en las actividades comiendo y paradas: las DOM comieron durante más tiempo a las 4 y 6 horas de la administración de la RTM, mientras que las SUB estuvieron más tiempo paradas en la hora 1, 2 y 4 luego de esto. A su vez, las vaquillonas DOM también rumiaron durante más tiempo que las SUB a lo largo de las 12 h de muestreo (Figura 5).

Cuadro V. Frecuencia de actividades (%) en las primeras 5 h posteriores a la administración del alimento en vaquillonas dominantes (DOM; n = 8) y subordinadas (SUB; n = 8) mantenidas en condiciones de competencia durante 120 días.¹

	Grupo			P		
	DOM	SUB	EEM	Gr	T	Gr*T
<i>Actividad (%)</i>						
Comiendo	45,6	42,9	1,5	0,17	<0,01	0,66
Rumiando ²	12,2	8,4	1,2	<0,01	<0,01	<0,01
Paradas	29,9	34,8	2,4	0,05	<0,01	0,13
Echadas	18,6	17,4	2,7	0,04	<0,01	<0,01
Caminando	0,4	1,2	0,2	0,09	0,88	0,45
Bebiendo	2,5	1,9	0,8	0,15	<0,01	0,11

¹Valores se presentan como media para las primeras 5 horas [(No. de actividades registradas/30 observaciones) × 100] del registro (hora 0 = suministro de la RTM) para cada período.

²En cada observación en que una vaquillona se encontraba rumiando, se registraba si la misma se encontraba echada ó parada, por lo tanto ésta actividad no es mutuamente excluyente con el resto.

Cuadro VI. Frecuencia de actividades (%) en las últimas 6 h posteriores a la administración del alimento en vaquillonas dominantes (DOM; n = 8) y subordinadas (SUB; n = 8) mantenidas en condiciones de competencia durante 120 días.¹

	Grupos			P		
	DOM	SUB	EEM	Gr	T	Gr*T
<i>Actividad (%)</i>						
Comiendo	8,5	10,1	2,7	0,55	<0,01	<0,01
Rumiando ²	31,9	30,3	1,9	0,13	<0,01	0,57
Paradas	47,3	44,8	2,3	0,08	<0,01	0,17
Echadas	42,7	44,2	4,2	0,65	<0,01	0,30
Caminando	2,1	1,6	0,5	0,93	<0,01	0,64
Bebiendo	3,2	2,8	0,6	0,09	<0,01	0,19

¹Valores se presentan como media para las últimas 6 horas [(No. de actividades registradas/36 observaciones) × 100] del registro (hora 0 = suministro de la RTM) para cada período.

²En cada observación en que una vaquillona se encontraba rumiando, se registraba si la misma se encontraba echada ó parada, por lo tanto ésta actividad no es mutuamente excluyente con el resto.

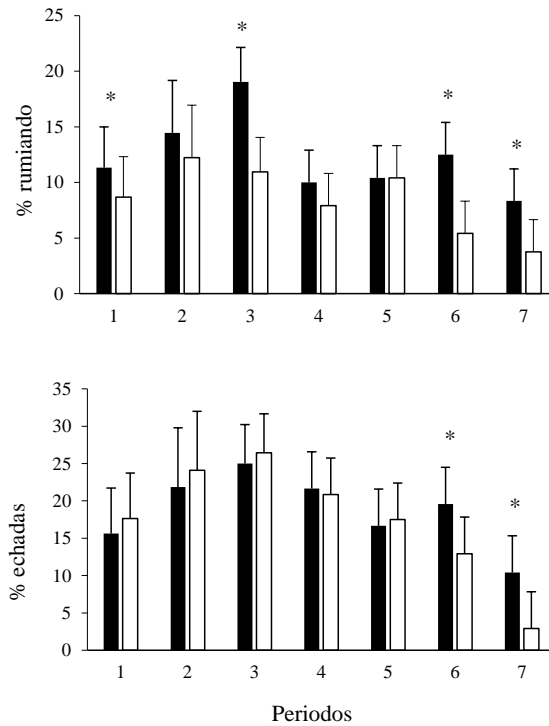


Figura 4. Frecuencia de actividades de rumia y descanso durante las primeras 5 h posteriores a la administración del alimento (total 12 h en cada Día; h 0 = suministro de la RTM) en vaquillonas dominantes (n = 8; barras blancas) y subordinadas (n = 8; barras blancas) mantenidas en condiciones de competencia durante 120 días. * $P \leq 0.05$.

No existieron diferencias en el CMS entre las vaquillonas DOM y SUB, pero las vaquillonas SUB comieron a una mayor tasa que las DOM en el periodo II, sin diferencias estadísticas en los períodos I y III (Cuadro VII).

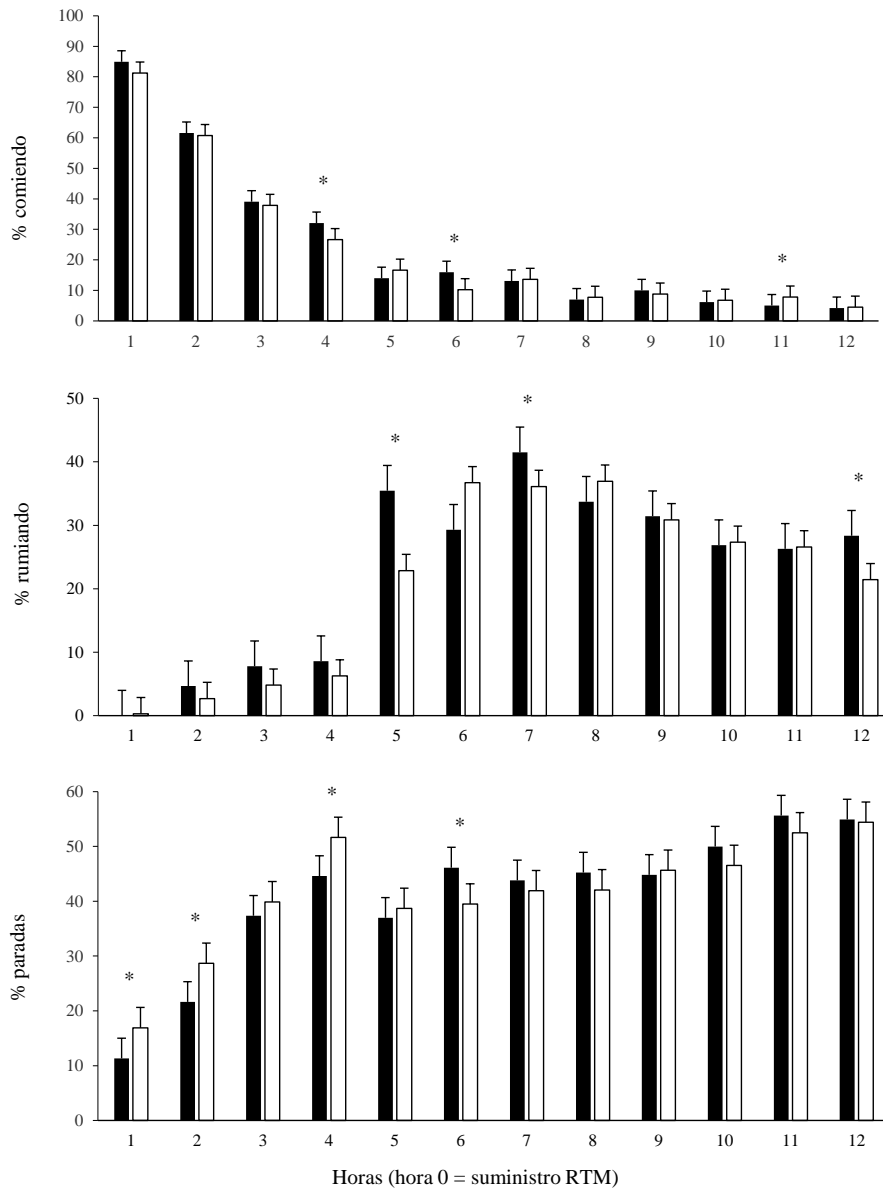


Figura 5. Frecuencia de actividades comiendo, rumiando y echadas a lo largo de las 12 h de registro de comportamiento (cada hora corresponde a la media de 7 periodos) en vaquillonas dominantes (n = 8; barras negras) y subordinadas (n = 8; barras blancas) mantenidas en condiciones de competencia durante 120 días. * $P < 0,05$ (en cada hora).

Cuadro VII. Consumo de materia seca (CMS) y tasa de consumo en vaquillonas dominantes (DOM; n = 8) y subordinadas (SUB; n = 8) mantenidas en condiciones de competencia durante 120 días.

	Grupo		EEM	P
	DOM	SUB		
CMS (kg/d) ^{1,3}				
Período I	6,2	6,2	0,3	0,49
Período II	6,6	7,0	0,3	0,16
Período III	7,4	7,5	0,3	0,42
Tasa de consumo (kg/min) ^{2,3}				
Período I	0,029	0,033	0,002	0,17
Período II	0,044	0,049	0,003	0,02
Período III	0,052	0,067	0,005	0,20

¹ El CMS de cada vaquillona fue estimado en los 3 períodos usando la técnica del doble marcador (Maeda et al., 2011).

² La tasa de consumo en cada período fue determinada como: CMS/tiempo total comiendo (se asumió que en los 10 min anteriores al registro de comportamiento la vaquillona se encontraba realizando la misma actividad).

³ Períodos I, II y III corresponden a los Días 17-26, 78-87 y 112-120 del experimento.

DISCUSIÓN GENERAL

En concordancia con la hipótesis general, en la presente tesis se demostró que tanto la BE como la dominancia social influyen sobre el desarrollo de las vaquillonas durante el periodo pre y peri-puberal. De acuerdo a la bibliografía consultada, hasta el momento no existían estudios que describieran el patrón de respuesta endócrina como ovárica a la BE en vaquillonas de carne en anestro. Por su parte, tampoco encontramos estudios anteriores en que se hayan evaluado los efectos de la dominancia social en condiciones de competencia sobre el desarrollo corporal y reproductivo de vaquillonas de razas lecheras pre-puberales.

En el Experimento I, la BE con NA por un periodo de 80 días resultó ser una alternativa eficaz para disminuir el anestro en vaquillonas de carne. A su vez, la secreción de LH y el desarrollo folicular en los primeros 10 y 30 días de exposición a los machos, respectivamente, fueron mayores en las vaquillonas expuestas a los NA que en las hembras aisladas, lo que coincide con los escasos estudios previos en que se caracterizaron los mecanismos de respuesta a la BE (Fernández et al., 1996; Bastidas et al., 1997; Roelofs et al., 2007; Berardinelli et al., 2009). En dichos estudios, la respuesta positiva en las concentraciones de LH se observó en forma más temprana que el presente estudio. Baruah & Kanchev (1993) reportaron diferencias luego de 80 min de comenzada la BE, mientras que Fernández et al. (1996) y Roelofs et al. (2007) encontraron concentraciones mayores de LH luego de 6 y 8 h de iniciada la exposición a los machos, respectivamente. En el presente estudio la primera muestra para determinación de LH fue extraída a las 16 h luego de comenzada la exposición a los NA, lo que imposibilitó encontrar una respuesta más aguda. A su vez, considerando que el estado nutricional de las vaquillonas al inicio del experimento (Fiol et al., 2010) influye directamente en la respuesta, y que las vaquillonas del presente trabajo no lograron una buena condición al inicio del trabajo, es posible que esto haya determinado un retraso en la respuesta en comparación con lo observado en pequeños rumiantes (2-4 min; Martin et al., 1986). Existen también otras diferencias a señalar entre el presente experimento y aquellos realizados en vacas durante el posparto. El tipo de estímulo utilizado fue diferente entre experimentos: mientras que Baruah & Kanchev (1993) evaluaron el tratamiento oronasal con orina de toros, Fernandez et al. (1996) expusieron vacas en forma continua ó intermitente (2 h cada tres días) a los toros durante 18 días, y Roelofs et al. (2007) expusieron a las vacas alambrado por medio a toros por un día. En todos estos estudios, se modificaron tanto las concentraciones medias y basales de LH (Fernandez et al., 1996; Roelofs et al., 2007). Por el contrario, Tauck et al. (2010) encontraron incrementos únicamente de la pulsatilidad de LH en las vacas expuestas en comparación con las aisladas de los machos. En suma, la falta de una respuesta homogénea y consistente en LH entre vaquillonas puede estar dada por las diferencias en el patrón general de respuesta a la BE en bovinos en comparación con los pequeños rumiantes. Mientras que los últimos presentan una respuesta homogénea y sincronizada (Ungerfeld et al., 2004), las vacas mostrarían una respuesta más tardía y dispersa en el tiempo (Ungerfeld, 2007; Fiol & Ungerfeld, 2012). Por tanto, es posible que sean necesarios diferentes tiempos de exposición a los machos para lograr una respuesta positiva en LH, lo que determinaría la dificultad para establecer el momento en que se desencadena la respuesta en cada individuo.

El estímulo de la secreción de LH y el consiguiente incremento del desarrollo folicular no fue acompañado por el inicio de la ciclicidad temprana en las vaquillonas expuestas a los NA, ya que el mismo sucedió en forma mucho más tardía (Día 60). La nutrición es uno de los principales factores que influyen en la edad de la pubertad (Day et al., 1986; Amstalden et al., 2000) y el desarrollo folicular (Mackey et al., 1999; Bossis et al., 2000; Diskin et al., 2003).

A su vez, el nivel nutricional determinado tanto por las tasas de ganancia de PV como por el PV al inicio de la exposición influye sobre la respuesta de las hembras a la BE (Roberson et al., 1991; Fiol et al., 2010). En el presente estudio, las vaquillonas presentaron un bajo PV para su categoría al inicio del experimento, así como tasas de ganancia de PV durante el mismo (0,1-0,2 kg/d) consideradas también bajas para la categoría (Engelken, 2008). Por lo tanto, el bajo nivel nutricional de las vaquillonas pudo ser el que limitó el crecimiento final del folículo pre-ovulatorio y la consiguiente ovulación (Lents et al., 2013). Sin embargo, es importante considerar que el plano nutricional era similar al que presentan las vaquillonas en las condiciones de los rodeos comerciales de Uruguay (Quintans et al., 2004, 2007), lográndose igual un efecto positivo de la BE en la ciclicidad de las vaquillonas. Por lo tanto, es posible plantear que: 1) la BE puede ser efectiva como alternativa para acortar el anestro aún en situaciones en que las vaquillonas presenten un bajo estado nutricional, y 2) para maximizar el uso de la BE como alternativa eficaz para el acortamiento del anestro, fundamentalmente en lo que refiere al intervalo para lograr una respuesta positiva, es necesario que las vaquillonas presenten niveles nutricionales adecuados.

En el Experimento II, las vaquillonas DOM presentaron un desarrollo reproductivo y corporal más precoz que las SUB al ser ambas mantenidas en condiciones de competencia durante 120 días. La edad y el PV con los que alcanzaron la pubertad fueron similares a los reportados anteriormente, tanto a nivel internacional (Chelikani et al., 2003; Davis Rincker et al., 2011) como local (de Trinidad, 2014). El momento de la pubertad se asocia con un incremento del tamaño folicular alcanzado (Bergfeld et al., 1994), coincidiendo con el mayor DFM y mayor número de folículos que presentaron las vaquillonas DOM del día 30 al 53, lo que corresponde al periodo inmediatamente anterior a la pubertad (Día 45-50). En concordancia, los niveles de glucosa fueron mayores en las DOM que en las SUB, lo que también se asocia a una menor edad al primer servicio (Brickell et al., 2009). El adelanto de la ciclicidad en vaquillonas de leche es especialmente relevante cuando el objetivo es lograr el primer servicio a los 15 meses, más aún considerando que la mayor cantidad de celos previos al servicio se relacionan con una mayor fertilidad (Byerley et al., 1987). Por lo tanto, sería esperable que las vaquillonas DOM presenten mayor fertilidad que las SUB al momento del servicio.

Las vaquillonas SUB presentaron una mayor tasa de consumo que las DOM, pero en contraposición a la hipótesis planteada, no existieron diferencias en el CMS entre vaquillonas de ambos rangos sociales. Esto último concuerda con la mayoría de los estudios previos, realizados tanto en condiciones de alimentación restringida (Keys et al., 1978; Longenbach et al., 1999) como *ad libitum* (González et al., 2008b; DeVries & von Keyserlingk, 2009). La tasa de consumo es un indicador de limitantes sociales al comportamiento ingestivo, y la misma se modifica en situaciones de alimentación restringida (Nielsen, 1999). Por lo tanto, es posible que el incremento de la tasa de consumo en las vaquillonas SUB haya evitado que estos animales tuvieran un menor CMS en comparación con las DOM. Si bien no fue posible determinar en qué momento finalizaban la RTM cada par de vaquillonas, las vacas lecheras consumen entre el 64-66% de su ingesta diaria durante las primeras 6 h posteriores al suministro de la comida (Nikkah, 2011), lo que coincide con las observaciones diarias en que las vaquillonas del presente estudio estaban consumiendo la RTM. A su vez, se encontraron diferencias en el tiempo en que las vaquillonas se encontraban comiendo durante los momentos de menor competencia por el alimento, pero es probable que durante esas horas ya no quedara más RTM en el comedero y que las vaquillonas no estuvieran realmente comiendo. En base a esto es posible especular que las vaquillonas SUB presentaron una mayor tasa de consumo fundamentalmente durante las primeras horas luego de administrada

la RTM, cuando las DOM monopolizaban el comedero y existía mayor cantidad de comida disponible. Por lo tanto, en situaciones de competencia, las vaquillonas DOM y SUB desplegaron un comportamiento ingestivo de diferente manera.

Las desviaciones del comportamiento esperado son indicadores del estado interno del animal (Friend, 1991). El mayor tiempo de rumia durante las primeras horas luego del suministro de la RTM en las vaquillonas DOM que en las SUB podría estar explicado por un inicio más temprano del consumo de alimento, y/o por diferencias en las estrategias desplegadas por ambas vaquillonas al enfrentarse a las condiciones competitivas. A su vez, durante esas primeras horas las vaquillonas SUB estuvieron más tiempo paradas y tendieron a caminar más que las DOM, mientras que las DOM estuvieron más tiempo echadas que las SUB. En éste sentido, tanto la disminución del tiempo de rumia (Grant & Albright, 2001) como del tiempo en que los animales se mantienen echados (Fregonesi et al., 2007), así como el incremento del tiempo en que se mantienen parados y caminando (Wilcox et al., 2013) se asocian con mayores niveles de estrés social. Según Gupta et al. (2008), cuando el animal se encuentra de pie está menos expuesto a los peligros y/o en una posición más activa que cuando se encuentra echado. Por lo tanto, es posible que en el presente estudio las vaquillonas SUB estuvieran más preparadas para cambios en su entorno que las DOM. En concordancia, diferentes estudios reportaron que el estatus social influye sobre la habilidad del animal para enfrentar las situaciones de estrés social (Huzzey et al., 2012; Proudfoot & Habing, 2015).

Las diferencias en el comportamiento ingestivo y en los niveles de estrés crónico entre ambos grupos de vaquillonas pueden asociarse tanto a las diferencias en los niveles de metabolitos sanguíneos como en el desarrollo reproductivo y corporal. Las vaquillonas DOM accedieron durante más tiempo a la comida en las primeras horas luego de suministrada la RTM, lo que pudo permitirles desplegar un mayor nivel de selección (DeVries et al., 2005; Greter et al., 2008; Ceacero et al., 2012), fundamentalmente de pequeñas partículas como las de grano de maíz. Por lo tanto, las vaquillonas DOM pudieron acceder a una dieta más energética por consumir mayor proporción de grano de maíz, lo que habría determinado una mayor producción de propionato en el rumen, y en consecuencia, una mayor glucemia que en las SUB (Wiltout & Satter, 1972). A su vez, las diferencias en el desarrollo reproductivo y corporal entre vaquillonas de ambos rangos también pueden asociarse a un mayor nivel de estrés social en las vaquillonas SUB que las DOM (Chebel et al., 2016). En éste sentido, si bien no se encontraron diferencias en el CMS entre vaquillonas de ambos rangos sociales, las DOM presentaron mayores GDP y fueron más precoces que las SUB, lo que también podría estar vinculado con un mayor nivel de estrés social en las últimas.

En el presente estudio, las vaquillonas se vieron sometidas a estrés calórico a lo largo del experimento (índice de temperatura-humedad > 72; Dash et al., 2016), y se ha reportado que animales en dichas condiciones presentan mayores concentraciones de colesterol (Scharf et al., 2010). El rango social influye sobre la respuesta a diferentes estresores o a condiciones restrictivas en diferentes especies (Chebel et al., 2016). El incremento de la competencia a nivel del comedero (por reducción del espacio de 1 a 0,6 m/vaca) determinó una disminución del tiempo de consumo, que fue mayor en las vacas SUB que en las DOM (Hetti Arachchige et al., 2014). En este sentido, las vaquillonas SUB podrían haberse visto más afectadas por el estrés calórico que las DOM, lo que determinó la mayor concentración de colesterol en las SUB que en las DOM. En concordancia, animales bajo estrés calórico presentan una menor glucemia (Nonaka et al., 2008), como fue observado en las vaquillonas SUB. A su vez, el estrés calórico afecta negativamente la eficiencia reproductiva en bovinos (Dash et al., 2016;

Das et al., 2016). En suma, tanto los mayores niveles de estrés social como de estrés calórico podrían haber afectado el crecimiento folicular y el inicio de la pubertad en las vaquillonas SUB.

Por lo tanto, las diferencias en el comportamiento ingestivo, en la utilización del alimento o en ambos, y en los niveles de estrés crónico entre vaquillonas de ambos rangos sociales, habrían determinado las mayores GDP y la mayor glucemia en las DOM que en las SUB. Finalmente, dichas diferencias serían las determinantes del desarrollo reproductivo más precoz en las vaquillonas DOM en comparación con las SUB.

CONCLUSIONES GENERALES

La bioestimulación y la dominancia social influyeron sobre el desarrollo corporal y reproductivo de las hembras en vaquillonas de carne y de leche, respectivamente.

En relación a la BE, se determinó que tanto el estímulo de la secreción de LH y del desarrollo folicular son responsables, al menos parcialmente, del adelanto en el inicio de la ciclicidad de las vaquillonas expuestas a los machos en comparación con las aisladas. El bajo estado nutricional de las vaquillonas durante el estudio pudo haber retrasado la respuesta a la BE. Por lo tanto, si bien la aplicación de la BE es una herramienta efectiva para disminuir el anestro en vaquillonas peri-puberales mantenidas en condiciones extensivas a campo natural, el estado nutricional es de especial relevancia para maximizar la respuesta.

Por su parte, las vaquillonas dominantes fueron reproductivamente más precoces, tuvieron mayores ganancias de PV y mayores niveles de glucosa a lo largo del estudio que las subordinadas. Además, existieron diferencias entre vaquillonas de ambos rangos sociales en la tasa de consumo de alimento y en los comportamientos indicadores de estrés crónico. Por tanto, las estrategias de adaptación de las vaquillonas frente a situaciones de competencia varían de acuerdo al estatus social que presenten.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abeni F, Calamari L, Stefanini L, Pirlo G. (2000). Effects of daily gain in pre- and postpubertal replacement dairy heifers on body condition score, body size, metabolic profile, and future milk production. *J Dairy Sci* 83 (7):1468-1478.
2. Alberio RH, Schiersmann G, Carou N, Mestre J. (1987). Effect of teaser bull on ovarian and behavioural activity of suckling beef cows. *Anim Reprod Sci* 14:263-272.
3. Alvarez L, Martin GB, Galindo F, Zarco LA. (2003). Social dominance of female goats affect their response to the male effect. *Appl Anim Behav Sci* 84:119-126.
4. Alvarez A, Ramos L, Zarco L. (2009). The ovulatory and LH responses to the male effect in dominant and subordinate goats. *Small Rum Res* 83:29-33.
5. Alves JRA, Antunes T, de Andrade A, Assis D, Gurjão TA, de Melo LRB, de Souza BB (2017). Productive and reproductive performance, behavior and physiology of cattle under heat stress conditions. *J Anim Behav Biometeorol* 5:91-96.
6. Arave CW, Mickelsen CH, Lamb RC, Svejda AJ, Canfield RV. (1977). Effects of dominance rank changes, age, and body weight on plasma corticoids of mature dairy cattle. *J Dairy Sci* 60:244-248.
7. Arije GF, Wiltbank JN. (1971). Age and weight at puberty in Hereford heifers. *J Anim Sci* 33:401-406.
8. Arije GF, Wiltbank JN. (1974). Prediction of age and weight at puberty in beef heifers. *J Anim Sci* 38:803-810.
9. Armstrong DG, Gong JG, Gardner JO, Baxter G, Hogg CO, Webb R. (2002). Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake. *Reproduction* 123:371-378.
10. Atkinson S, Williamson P. (1985). Ram-induced growth of ovarian follicles and gonadotrophin inhibition in anoestrous ewes. *J Reprod Fert* 73:185-189.
11. Bach A, Valls N, Solans A, Torrent T. (2008). Associations between nondietary factors and dairy herd performance. *J Dairy Sci* 91:3259-3267.
12. Barash H, Bar-Meirb Y, Bruckental I. (1994). Effects of a low-energy diet followed by a compensatory diet on growth, puberty and milk production in dairy heifers. *Livest Prod Sci* 39:263-268.
13. Baruah KK, Kanchev LN. (1993). Hormonal responses to olfactory stimulation with bull urine in postpartum dairy cows. *Proc.VII World Conf. Anim Prod* 3:356-359.
14. Bastidas P, Ruiz J, Manzo M, Silva O, Guerrero N, Trocóniz J. (1997). Effect of bull exposure on corpus luteum function and ovarian activity in prepuberal Brahman heifers. *Arch Latinoam Prod Anim* 5 (1):390-392.
15. Berardinelli JG, Fogwell RL, Inskip EK. (1978). Effect of electrical stimulation or presence of a bull on puberty in beef heifers. *Theriogenology* 9:133-138.
16. Berardinelli JG, Joshi PS. (2005). Initiation of postpartum luteal function in primiparous restricted-suckled beef cows exposed to a bull or excretory products of bulls or cows. *J Anim Sci* 83:2495-2500.
17. Berardinelli JG, Tauck SA. (2007). Intensity of the biostimulatory effect of bulls on resumption of ovulatory activity in primiparous, suckled, beef cows. *Anim Reprod Sci* 99:24-33.
18. Berardinelli JG, Wilkinson JRC, Tauck SA, Olsen JR, Wedlake RJ. (2009). Duration of daily bull exposure on follicular wave dynamics of postpartum, anovular, suckled cows. *Biol Reprod* 81:544.
19. Bergfeld EGM, Kojima FN, Cupp AS, Wehrman ME, Peters KE, Garcia-Winder M, Kinder JE. (1994). Ovarian follicular development in prepubertal heifers is influenced by level of dietary energy intake. *Biol Reprod* 51:1051-1057.

20. Bouissou MF. (1972). Influence of body weight and presence of horns on social rank in domestic cattle. *Anim Behav* 20:474-477.
21. Bøe KE, Færevik G. (2003). Grouping and social preferences in calves, heifers and cows. (2003). *App Anim Behav Sci* 80:175-190.
22. Brickell JS, McGowan MM, Wathes DC. (2009). Effect of management factors and blood metabolites during the rearing period on growth in dairy heifers on UK farms. *Domest Anim Endocrinol* 36:67-81.
23. Byerley DJ, Staigmillet RB, Berardinelli JG, Short RE. (1987). Pregnancy rates of beef heifers bred either on puberal or third estrus. *J Anim Sci* 65:645-650.
24. Cavestany D, Kulcsa M, Crespi D, Chilliard Y, La Manna A, O Balogh O, Keresztes M, Delavaud C, Huszenicza G, Meikle A. (2009). Effect of prepartum energetic supplementation on productive and reproductive characteristics, and metabolic and hormonal profiles in dairy cows under grazing conditions. *Reprod Dom Anim* 44:663-671.
25. Ceacero F, García AJ, Landete-Castillejos T, Bartosova J, Bartos L, Gallego L. (2012). Benefits for dominant red deer hinds under a competitive feeding system: food access behavior, diet and nutrient selection. *PLoS ONE* 7(3):e32780.
26. Chebel RC, Silva PRB, Endres MI, Ballou MA, Luchterhand KL. (2016). Social stressors and their effects on immunity and health of periparturient dairy cows. *J Dairy Sci* 99:3217–3228.
27. Chelikani PK, Ambrose JD, Kennelly JJ. (2003). Effect of dietary energy and protein density on body composition, attainment of puberty, and ovarian follicular dynamics in dairy heifers. *Theriogenology* 60:707-725.
28. Chelikani PK, Ambrose DJ, Keisler DH, Kennelly JJ. (2009). Effects of dietary energy and protein density on plasma concentrations of leptin and metabolic hormones in dairy heifers. *J Dairy Sci* 92:1430–1441.
29. Chenoweth PJ. (1983). Reproductive management procedures in control of breeding. *Anim Prod Australia* 15:28-31.
30. Ciccioli NH, Charles-Edwards SL, Floyd C, Wettemann RP, Purvis HT, Lusby KS, Horn GW, Lalman DL. (2005). Incidence of puberty in beef heifers fed high- or low-starch diets for different periods before breeding. *J Anim Sci* 83:2653-2662.
31. Conaprole. (2008). Ficha Técnica N°8 1ra Ed. Editor: Repetto JL, Cajarville C, Mendoza A, Oleggini G. <http://www.eleche.com.uy/files/ficha-8-recrta-intensiva-990?es>.
32. Craig JV. (1986) Measuring social behavior: social dominance. *J Anim Sci* 62:1120-1129.
33. Custer EE, Berardinelli JG, Short RE, Wehrman M, Adair R. (1990). Postpartum interval to estrus and patterns of LH and progesterone in first-calf suckled beef cows exposed to mature bulls. *J Anim Sci* 68:1370-1377.
34. Day ML, Imakawa K, Garcia-Winder M, Zalesky DD, Schanbacher BD, Kittok RJ, Kinder JE. (1984). Endocrine mechanisms of puberty in heifers: Estradiol negative feedback regulation of luteinizing hormone secretion. *Biol Reprod* 31:332-341.
35. Day ML, Imakawa K, Zalesky DD, Kittok RJ, Kinder JE. (1986). Effects of restriction of dietary energy intake during the prepubertal period on secretion of luteinizing hormone and responsiveness of the pituitary to luteinizing hormone-releasing hormone in heifers. *J Anim Sci* 62:1641-1648.
36. Day ML, Imakawa K, Wolfe PL, Kittok RJ, Kinder JE. (1987). Endocrine mechanisms of puberty in heifers: Role of hypothalamo-pituitary estradiol receptors in the negative feedback of estradiol on luteinizing hormone secretion. *Biol Reprod* 37:1054-1065.

37. Day ML, Anderson LH. (1998). Current concepts on the control of puberty in cattle. *J Anim Sci* 76:1-15.
38. Das R, Sailo L, Verma N, Bharti P, Saikia J, Imtiwatin, Kumar R. (2016). Impact of heat stress on health and performance of dairy animals: a review. *Veterinary World* 9 (3):260-268.
39. Dash S, Chakravarty AK, Singh A, Upadhyay A, Singh M, Yousuf S. (2016). Effect of heat stress on reproductive performances of dairy cattle and buffaloes: a review. *Veterinary World* 9:235-244.
40. Davis Rincker LE, VandeHaar MJ, Wolf CA, Liesman JS, Chapin LT, Weber Nielsen MS. (2011). Effect of intensified feeding of heifer calves on growth, pubertal age, calving age, milk yield, and economics. *J Dairy Sci* 94:3554–3567.
41. Trinidad S. (2014). Alimentación diferencial durante la etapa lactante en terneras Holstein: efectos inmediatos y residuales sobre el crecimiento, desarrollo corporal y pubertad. Tesis Maestría (MSc), Programa de Posgrados de la Facultad de Veterinaria, UdelaR, Montevideo, Uruguay.
42. Delgadillo JA, Gelez H, Ungerfeld R, Hawken PAR, Martin GB. (2009). The ‘male effect’ in sheep and goats-Revisiting the dogmas. *Behav. Brain Res.* 200:304-314.
43. DeVries TJ, von Keyserlingk MAG, Beauchemin KA. (2005). Frequency of feed delivery affects the behavior of lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 88:3553–3562.
44. DeVries TJ, von Keyserlingk MAG. (2009a). Competition for feed affects the feeding behavior of growing dairy heifers. *J Dairy Sci* 92:3922–3929.
45. DeVries TJ, von Keyserlingk MAG. (2009b). *Short communication*: Feeding method affects the feeding behavior of growing dairy heifers. *J Dairy Sci* 92:1161-1168.
46. DeVries TJ. (2010). Review: Behaviour and its role in the nutritional management of the growing dairy heifer. *Can. J Anim Sci* 90:295-302.
47. DIEA. (2017). Anuario estadístico agropecuario 2017. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección de Estadísticas Agropecuarias, Uruguay. <http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/diea-anuario2017web01a.pdf>
48. Diskin MG, Kenny DA. (2014). Optimising reproductive performance of beef cows and replacement heifers. *Animal* 8 (1):27-39.
49. Diskin MG, Kenny DA. (2016). Managing the reproductive performance of beef cows. *Theriogenology* 86:379-387.
50. Dobson H, Ghuman S, Prabhakar S, Smith R. (2003). A conceptual model of the influence of stress on female reproduction. *Reproduction* 125:151–163.
51. Dodson SE, McLeod BJ, Haresign W, Peters AR, Lamming GE. (1988). Endocrine changes from birth to puberty in the heifer. *J Reprod Fert* 82:527-538.
52. Drews C. (1993). The concept and definition of dominance in animal behaviour. *Behaviour* 125:283-312.
53. Engelken TJ. (2008). Developing replacement beef heifers. *Theriogenology* 70:569-572.
54. Evans ACO, Adams GP, Rawlings NG. (1994a). Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. *J Reprod Fertil* 102:463-470.
55. Evans ACO, Adams GP, Rawlings NG. (1994b). Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first ovulation in prepubertal heifers. *J Reprod Fertil* 100:187-194.
56. Fernandez DL, Berardinelli JG, Short RE, Adair R. (1996). Acute and chronic changes in luteinizing hormone secretion and postpartum interval to estrus in first-calf suckled beef cows exposed continuously or intermittently to mature bulls. *J Anim Sci* 74:1098-1103.

57. Ferrell CL. (1982). Effects of postweaning rate of gain on onset of puberty and productive performance of heifers of different breeds. *J Anim Sci* 55:1272-1283.
58. Fiol C, Quintans G, Ungerfeld R. (2010). Response to biostimulation in peri-puberal beef heifers: influence of male-female proximity and heifer's initial body weight. *Theriogenology* 74:569-575.
59. Fiol C, Ungerfeld R. (2011). Males' sexual preference toward heavier heifers is only observed in competitive situations with lighter heifers. *Lives Sci* 139:281–284.
60. Fiol C, Ungerfeld R. (2012). Biostimulation in cattle: stimulation pathways and mechanisms of response. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 15, Issue Suppl 1:S29-S45.
61. Fregonesi JA, Tucker CB, Weary DM. (2007). Overstocking reduces lying time in dairy cows. *J Dairy Sci* 90:3349–3354.
62. Friend TH. (1991). Symposium: Response of animals to stress. Behavioral Aspects of Stress. *J Dairy Sci* 74:292-303.
63. Gelez H, Fabre-Nyz C. (2006). Role of the olfactory systems and importance of learning in the ewes' response to rams or their odors. *Reprod Nutr Dev* 46:401-415.
64. González LA, Ferret A, Manteca X, Ruiz-de-la-Torre JL, Calsamiglia S, Devant M, Bach A. (2008a). Performance, behavior, and welfare of Friesian heifers housed in pens with two, four, and eight individuals per concentrate feeding place. *J Anim Sci* 86:1446-1458.
65. González LA, Ferret A, Manteca X, Ruiz-de-la-Torre JL, Calsamiglia S, Devant M, Bach A. (2008b). Effect of the number of concentrate feeding places per pen on performance, behavior, and welfare indicators of Friesian calves during the first month after arrival at the feedlot. *J Anim Sci* 86:419-431.
66. Grant RJ, Albright JL. (2001). Effect of animal grouping on feeding behavior and intake of dairy cattle. *J Dairy Sci* 84(E. Suppl.):E156-E163.
67. Granger AL, Wyatt WE, Hembry FG, Craig WM, Thompson DL. (1990). Effects of breed and wintering diet on heifer postweaning growth and development. *J Anim Sci* 68:304-316.
68. Greer RC, Whitman RW, Staigmiller RB, Anderson DC. (1983). Estimating the impact of management decisions on the occurrence of puberty in beef heifers. *J Anim Sci* 56:30-39.
69. Greter AM, DeVries TJ, von Keyserlingk MA. (2008). Nutrient intake and feeding behavior of growing dairy heifers: effects of dietary dilution. *J Dairy Sci* 91:2786-2795.
70. Greter AM, Leslie KE, Mason GJ, McBride BW, DeVries TJ. (2010). Effect of feed delivery method on the behavior and growth of dairy heifers. *J Dairy Sci* 93:1668-1676.
71. Guggeri A, Meikle A, Carriquiry M, Montossi F, De Barbieri I, Viñoles C. (2014). Effect of different management systems on growth, endocrine parameters and puberty in Hereford female calves grazing Campos grassland. *Livest Sci* 167:455-462.
72. Gupta S, Earley B, Nolan M, Formentin E, Crowe MA. (2008). Effect of repeated regrouping and relocation on behaviour of steers. *Appl Anim Behav Sci* 110:229–243.
73. Heinrichs AJ, Swartz LA. (1990). Management of dairy heifers. Pennsylvania State Univ. Ext. Circ. 385, University Park.
74. Heinrichs AJ, Rogers GW, Cooper JB. (1992). Predicting body weight and wither height in holstein heifers using body measurements. *J Dairy Sci* 75:3576-3581.
75. Heinrichs J, Lammers B. (2008). Monitoring dairy heifer growth. Penn State College of Agricultural Sciences research. https://extension.psu.edu/downloadable/download/sample/sample_id/2204/

76. Heinrichs AJ, Zanton GI, Lascano GJ, Jones CM. (2017). *A 100-Year Review: A century of dairy heifer research*. J Dairy Sci 100:10173–10188.
77. Hess BW, Lake SL, Scholljegerdes EJ, Weston TR, Nayigihugu V, Molle JDC, Moss GE. (2005). Nutritional controls of beef cow reproduction. J Anim Sci 83 (E. Suppl.): E90-E106.
78. Hessing MJC, Scheepens CJM, Schouten WGP, Tielen MJM, Wiepkema PR. (1994). Social rank and disease susceptibility in pigs. Veterinary Immunology and Immunopathology 43:373-387.
79. Hetti Arachchige AD, Fisher AD, Wales WJ, Auldish MJ, Hannah MC, Jongman EC. (2014). Space allowance and barriers influence cow competition for mixed rations fed on a feed-pad between bouts of grazing. J Dairy Sci 97:3578-3588.
80. Hoffman PC. (1997). Optimum body size of Holstein replacement heifers. J Anim Sci 75:836-845.
81. Huzzey JM, Nydam DV, Grant RJ, Overton TR. (2012). The effects of overstocking Holstein dairy cattle during the dry period on cortisol secretion and energy metabolism. J Dairy Sci 95:4421-4433.
82. Ingrand S., Agabriel J., Dedieu B., Lassalas J. (2001). Effects of reducing access to food on intake and feeding behaviour of loose-housed dry Charolais cows. Anim. Res. 50:145-148.
83. Keys JE, Pearson RE, Thompson PD. (1978). Effect of feedbunk stocking density on weight gains and feeding behavior of yearling Holstein heifers. J Dairy Sci 61:448-454.
84. Landaeta-Hernández AJ, Meléndez P, Bartolomé J, Rae O, Archbald LF. (2008). The effect of bull exposure on the early postpartum reproductive performance of suckling Angus cows. Revista científica FCV-LUZ XVIII:682-691.
85. Larson RL. (2007). Heifer development: Reproduction and nutrition. Vet Clin Food Anim 23:53-68.
86. Le Cozler Y, Lollivier V, Lacasse P, Disenhaus C. (2008). Rearing strategy and optimizing first-calving targets in dairy heifers: a review. Animal 2:1393-1404.
87. Lents CA, White FJ, Ciccio NH, Floyd-White LN, Rubio I, Keisler DH, Spicer LJ, Wettemann RP. (2013). Metabolic status, gonadotropin secretion, and ovarian function during acute nutrient restriction of beef heifers. J Anim Sci 91:4146-4157.
88. Lesmeister JL, Burfening PJ, Blackwell RL. (1973). Date of first calving in beef cows and subsequent calf production. J Anim Sci 36:1-6.
89. Longenbach JI, Heinrichs AJ, Graves RE. (1999). Feed bunk length requirements for Holstein dairy heifers. J Dairy Sci 82:99-109.
90. Macmillan KL, Allison AJ, Struthers GA. (1979). Some effects of running bulls with suckling cows or heifers during the pre-mating period. N Z J Exp Agric 7:121-124.
91. Manteca X. 2009. *Etología Veterinaria*. 1st ed. Multiméfica Ediciones Veterinarias, Barcelona, España.
92. Marston TT, Lusby KS, Wettemann RP. (1995). Effects of postweaning diet on age and weight at puberty and milk production of heifers. J Anim Sci 73: 63-68.
93. Martin GB, Scaramuzzi RJ, Lindsay DR. (1983). Effect of the introduction of rams during the anoestrous season on the pulsatile secretion of LH in ovariectomized ewes. J Reprod Fertil 67: 47-55.
94. Martin GB, Oldham CM, Cognié Y, Pearce DT. (1986). The physiological responses of anovulatory ewes to the introduction of rams- A review. Livestock Prod Sci 15: 219-247.
95. McCann JP, Hansel W. (1986) Relationships between insulin and glucose metabolism and pituitary-ovarian functions in fasted heifers. Biol Repro 34:630-641.

96. Meyer TL, Stalker LA, Volesky JD, Adams DC, Funston RN. (2012). Technical note: Estimating beef-cattle forage demand: Evaluating the animal unit concept. Faculty Papers and Publications in Animal Science. Paper 860. <http://digitalcommons.unl.edu/animalscifacpub/860>.
97. Montgomery SP, Sindt JJ, Greenquist MA, Miller WF, Pike JN, Loe ER, Sulpizio MJ, Drouillard JS. (2009). Plasma metabolites of receiving heifers and the relationship between apparent bovine respiratory disease, body weight gain, and carcass characteristics. *J Anim Sci* 87:328-333.
98. Mooring MS, Patton ML, Lance VA, Hall BM, Schaad EW, Fetter GA, Fortin SS, McPeak KM. (2006). Glucocorticoids of bison bulls in relation to social status. *Horm & Behav* 49:369-375.
99. Nielsen BL. (1999). On the interpretation of feeding behaviour measures and the use of feeding rate as an indicator of social constraint. *Appl Anim Behav Sci* 63: 79-91.
100. Nikkhah A. (2011) Ruminant chronophysiological management: an emerging bioscience. *Open Access Animal Physiology* 3:9-12.
101. Nonaka I, Takusari N, Tajima K, Suzuki T, Higuchi K, Kurihara M. (2008). Effects of high environmental temperatures on physiological and nutritional status of prepubertal Holstein heifers. *Livest Sci* 113:14-23.
102. National Research Council (NRC). (2001). *Nutrient Requirements of Dairy Cattle* 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington DC.
103. Oliveira CMG, Oliveira Filho BD, Gambarini ML, Viu MAO, Lopes DT, Sousa APF. (2009). Effect of biostimulation and nutritional supplementation on pubertal age and pregnancy rates of Nelore heifers (*Bos indicus*) in a tropical environment. *Anim Reprod Sci* 113:38-43.
104. Olofsson J. (1999). Competition for total mixed diets fed for ad libitum intake using one or four cows per feeding station. *J Dairy Sci* 82:69-79.
105. Partida JA, Olleta JL, Campo MM, Sañudo C, María GA. (2007). Effect of social dominance on the meat quality of young Friesian bulls. *Meat Science* 76:266-273.
106. Patterson DJ, Perry RC, Kiracofe GH, Bellows RA, Staigmiller RB, Corah LR. (1992). Management considerations in heifer development and puberty. *J Anim Sci* 70: 4018-4035.
107. Pempek JA, Eastridge ML, Swartzwelder SS, Daniels KM, Yohe TT. (2016). Housing system may affect behavior and growth performance of Jersey heifer calves. *J Dairy Sci* 99:569-578.
108. Pereira G. (2003). La ganadería en Uruguay. Contribución a su conocimiento. División Estadísticas Agropecuarias (DIEA), Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Uruguay. Disponible en: www.mgap.gub.uy
109. Perry GA. (2016). Factors affecting puberty in replacement beef heifers. *Theriogenology* 86:373-378.
110. Phillips CJC, Rind MI. (2002). The effects of social dominance on the production and behavior of grazing dairy cows offered forage supplements. *J Dairy Sci* 85:51-59.
111. Pirlo G, Miglior F, Speroni M. (2000). Effect of age at first calving on production traits and on difference between milk yield returns and rearing costs in Italian Holsteins. *J Dairy Sci* 83:603–608.
112. Proudfoot K, Habing G. (2015). Social stress as a cause of diseases in farm animals: Current knowledge and future directions. *The Veterinary Journal* 206:15-18.
113. Quadros SAF, Lobato JFP. (2004). Biostimulation and reproductive performance of beef heifers. *Rev Bras Zoot* 33:679-683.
114. Quintans G, Straumann JM, Ayala W, Vázquez A. (2004). Effect of winter management on the onset of puberty in beef heifers under grazing conditions. 15th

- International Congress of Animal Reproduction, 8-12 August, Porto Seguro, Brazil, Abstract No. 22.
115. Quintans G, Barreto S, Negrín D, Ayala W. (2007). Efecto de la tasa de ganancia invernal en el inicio de la pubertad de terneras de biotipos carniceros en pastoreo. XXX Reunión anual de la Asociación Peruana de Producción Animal, Cuzco, Perú, (PB044), pp. 447.
 116. Rault J.L. (2012). Friends with benefits: Social support and its relevance for farm animal welfare. *Appl Anim Behav Sci* 136:1-14.
 117. Rawlings NC, Evans ACO, Honaramooz A, Bartlewski PM. (2003). Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. *Anim Reprod Sci* 78:259-270.
 118. Rekwot PI, Ogwy D, Oyedipe E, Sekoni V. (2000). Effects of bull exposure and body growth on onset of puberty in Bunajii and Friesian x Bunajii heifers. *Reprod Nutr Dev* 40:359-367.
 119. Roberson MS, Ansotegui RP, Berardinelli JG, Whitman RW, McInerney MJ. (1987). Influence of biostimulation by mature bulls on occurrence of puberty in beef heifers. *J Anim Sci* 64:1601-1605.
 120. Roberson MS, Wolfe MW, Stumpf TT, Werth LA, Cupp AS, Kojima N, Wolfe PL, Kittok PJ. (1991). Influence of growth rate and exposure to bulls on age at puberty in beef heifers. *J Anim Sci* 69:2092-2098.
 121. Roche J.R., Friggens N.C., Kay J.K., Fisher M.W., Stafford K.J., Berry D.P. (2009). Invited review: Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *J. Dairy Sci* 92:5769-5801.
 122. Roche J.R., Dennis N.A., Macdonald K.A., Phyn C.V.C., Amer P.R., White R.R., Drackley J.K. (2015). Growth targets and rearing strategies for replacement heifers in pasture-based systems: a review. *Anim Prod Sci* 55:902–915.
 123. Roelofs JB, Soede NM, Dieleman SJ, Voskamp-Harkema W, Kemp B. (2007). The acute effect of bull presence on plasma profiles of luteinizing hormone in postpartum, anoestrous dairy cows. *Theriogenology* 68:902-907.
 124. Sartori R, Mendes Guardieiro M. (2010). Fatores nutricionais associados à reprodução da fêmea bovina. *R Bras Zootec* 39:422-432.
 125. Scaramuzzi RJ, Martin GB. (2008). The importance of interactions among nutrition, seasonality and socio-sexual factors in the development of hormone-free methods for controlling fertility. *Reprod Dom Anim* 43:129–136.
 126. Scharf B, Carroll JA, Riley DG, Chase Jr. CC, Coleman SW, Keisler DH, Weaber RL, Spiers DE. (2010). Evaluation of physiological and blood serum differences in heat-tolerant (Romo sinuano) and heat-susceptible (Angus) *Bos taurus* cattle during controlled heat challenge. *J Anim Sci* 88:2321-2336.
 127. Sejrsen K. (1994). Relationships between nutrition, puberty and mammary development in cattle. *Proc Nutr Soc* 53:103-111.
 128. Sejrsen K, Purup S. (1997). Influence of prepubertal feeding level on milk yield potential of dairy heifers: a review. *J Anim Sci* 75:828-835.
 129. Short RE, Bellows RA. (1971). Relationships among weight gains, age at puberty and reproductive performance in heifers. *J Anim Sci* 32:127-131.
 130. Schubach KM, Cooke RF, Brandão AP, Lippolis KD, Silva LGT, Marques RS, Bohnert DW. (2017). Impacts of stocking density on development and puberty attainment of replacement beef heifers. *Animal* 11:2260-2267.
 131. Signoret JP. (1991). Sexual pheromones in the domestic sheep: importance and limits in the regulation of reproductive physiology. *J Steroid Biochem Molec Biol* 39:639-645.

132. Sotelo F. (2017). Indicadores Reproductivos: Análisis de registros y su distribución histórica. Informes Técnicos Instituto Nacional para el Control y Mejoramiento Lechero: Montevideo, Uruguay.
133. Stewart TS, Long CR, Cartwright TC. (1980). Characterization of cattle of a five-breed diallel. II: Puberty in bulls and heifers. *J Anim Sci* 50:808-820.
134. Tauck SA, Olsen JR, Wilkinson JRC, Berardinelli JG. (2010). Duration of daily bull exposure on resumption of ovulatory activity in postpartum, primiparous, suckled, beef cows. *Anim Reprod Sci* 118:13-18.
135. Taylor VJ, Beever DE, Bryant MJ, Wathes DC. (2004). First lactation ovarian function in dairy heifers in relation to prepubertal metabolic profiles. *J Endocrin* 180:63-75.
136. Tozer PR, Heinrichs AJ. (2001). What affects the costs of raising replacement dairy heifers: A multiple-component analysis. *J Dairy Sci* 84:1836-1844.
137. Ungerfeld R, Pinczak A, Forsberg M, Rubianes E. (2002). Ovarian and endocrine responses of Corriedale ewes to "ram effect" in the non-breeding season. *Can J Anim Sci* 82:599-602.
138. Ungerfeld R. (2003). The reproductive response of anestrus ewes to the introduction of rams. Tesis de Doctorado (PhD), Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Suecia. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae. Veterinaria* 163, pp 66.
139. Ungerfeld R. (2007). Socio-sexual signalling and gonadal function: Opportunities for reproductive management in domestic ruminants. En: *Reproduction in Domestic Ruminants VI*, Juengel JI, Murray JF, Smith MF (Eds.), Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp, 207-221.
140. Ungerfeld R. (2009). Short-term exposure of high body weight heifers to testosterone-treated steers increases pregnancy rate during early winter bull breeding. *Anim Reprod* 6 (3):446-449.
141. Val-Laillet D, de Passille' AM, Rushen J, von Keyserlingk MAG. (2008). The concept of social dominance and the social distribution of feeding-related displacements between cows. *Appl Anim Behav Sci* 111:158-172.
142. Velazquez MA, Spicerb LJ, Wathes DC. (2008). The role of endocrine insulin-like growth factor-I (IGF-I) in female bovine reproduction. *Dom Anim Endocr* 35:325-342.
143. Walkden-Brown SW, Martin GB, Restall BJ. (1999). Role of male-female interaction in regulating reproduction in sheep and goats. *J Reprod Fertil (Suppl)* 54:243-257.
144. Wathes DC, Pollot GE, Johnson KF, Richardson H, Cooke JS. (2014). Heifer fertility and carry over consequences for life time production in dairy and beef cattle. *Animal* 8:91-104.
145. Webb R, Garnsworthy PC, Gong JG, Armstrong DG. (2004). Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *J Anim Sci* 82:E63-E74.
146. Wilcox CS, Schutz MM, Rostagno MR, Lay Jr DC, Eicher SD. (2013). Repeated mixing and isolation: Measuring chronic, intermittent stress in Holstein calves. *J Dairy Sci* 96:7223-7233.
147. Wiltrout DW, Satte LD. (1972). Contribution of propionate to glucose synthesis in the lactating and nonlactating cow. *J Dairy Sci* 55:307-317.
148. Yelich JV, Wettemann RP, Dolezal HG, Lusby KS, Bishop DK, Spicer LJ. (1995). Effects of growth rate on carcass composition and lipid partitioning at puberty and growth hormone, insulin-like growth factor I, insulin, and metabolites before puberty in beef heifers. *J Anim Sci* 73:2390-2405.

149. Yelich JV, Wettemann RP, Marston TT, Spicer LJ. (1996). Luteinizing hormone, growth hormone, insulin-like growth factor-I, insulin and metabolites before puberty in heifers fed to gain at two rates. *Dom Anim End* 13:325-338.
150. Zalesky DD, Day ML, Garcia Winder M, Imakawa K, Kittok RJ, D'Occhio MJ, Kinder JE. (1984). Influence of exposure to bulls on resumption of estrous cycles following parturition in beef cows. *J Anim Sci* 59:1135-1139.
151. Zanton GI, Heinrichs AJ. (2005). Meta-analysis to assess effect of prepubertal average daily gain of Holstein heifers on first-lactation production. *J Dairy Sci* 88:3860-3867.

ANEXOS

Publicación I.

Fiol C, Ungerfeld R. (2016). “Positive effects of biostimulation on luteinizing hormone concentration and follicular development in anestrous beef heifers”. *J Anim Sci* 94: 971-977. Incluida en esta tesis con el aval de Elsevier.

Publicación II.

Fiol C, Carriquiry M, Ungerfeld R. (2017). “Social dominance in prepubertal dairy heifers allocated in continuous competitive dyads: Effects on body growth, metabolic status, and reproductive development”. *J Dairy Sci* 100: 2351-2359. Incluida en esta tesis con el aval de Elsevier.

Publicación III.

Fiol C, Aguerre M, Carriquiry M, Ungerfeld R. (2019). “Social dominance affects intake rate and behavioral time budget in pre-pubertal dairy heifers allocated in continuous competitive situations”. *Animal* 13:6, 1297-1303.

Positive effects of biostimulation on luteinizing hormone concentration and follicular development in anestrus beef heifers¹

C. Fiol*² and R. Ungerfeld†

*Departamento de Bovinos and †Departamento de Fisiología,
Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo 11600, Uruguay

ABSTRACT: The objectives of this study were to characterize the LH secretion pattern and the follicular development of anestrus beef heifers during early exposure (first 30 d of exposure) to androgenized steers (AS) and to determine if exposure to AS for 80 d (includes the first 30 d and 50 d more) advances the onset of ovarian cyclic activity. Twenty-nine anestrus Hereford heifers (20.2 ± 4.1 mo old and 257.5 ± 32.5 kg of BW) were allocated to 2 homogeneous groups according to their age and BW: 1) heifers exposed to AS (group EH; $n = 15$) for 80 d and 2) control heifers, isolated from AS and any other male during all the course of the study (group CH; $n = 14$). On d 0, 3 AS were joined with the EH group, which were removed and replaced with other 3 AS on Day 14. On d -10, 1, 10, 20, and 30, 8 heifers per group were housed in individual stalls and blood samples for LH were collected at 15-min intervals for 6 h. From d -10 to 30, the maximum follicle diameter (MFD) and the presence of a corpus luteum (CL) was daily recorded by ultrasound scanning and estrous behavior was detected twice daily. The emergence of follicular waves (FW), defined as the day when the dominant follicle of a wave

was first observed (3–4 mm diam.), was retrospectively determined. Afterward, ultrasound scanings were performed weekly from d 32 to 60 and on d 70 and 80 to determine the presence of CL. After 10 d of male exposure, LH concentrations, either mean (1.67 vs. 0.88 ng/mL [SEM 0.09]) or basal (1.53 vs. 0.74 ng/mL [SEM 0.09]), were greater ($P < 0.05$) in the EH group than in the CH group. There was a treatment effect in MFD, as it was greater in EH than in CH ($P = 0.05$; 8.00 ± 0.16 vs. 7.52 ± 0.17 mm, respectively), but none of those follicles ovulated during the 40-d period. The MFD of the second FW was greater in EH than in CH, in coincidence with the transient increase on LH concentrations, which probably induced the greater follicular growth. Cumulative proportions of heifers that started to cycle were greater ($P = 0.01$) in EH than in CH on d 60 (33.3 vs. 0%), 70 (47 vs. 0%; $P < 0.005$), and 80 (53 vs. 0%; $P < 0.001$) of the exposure period. In conclusion, exposure of anestrus beef heifers to AS resulted in a transient increase on LH secretion after 10 d of male exposure and increased follicular diameter attained during the second FW. In addition, ovarian cyclic activity was advanced in exposed heifers.

Key words: cattle, male effect, puberty, ruminants, sociosexual signals

© 2016 American Society of Animal Science. All rights reserved.

J. Anim. Sci. 2016.94:971–977

doi:10.2527/jas2015-9396

¹We are especially grateful to Nicolás Curbelo, Gabriel Larraz, and Leonardo de Melo Menezes for their help during all the course of the experiment. We also thank Fernando Perdígón, José Hernandez, Jorge Olivero, and Jorge Rodríguez for their help in animal management and Tatiana Morales, Ma. Laura Núñez, Daniela Carnales, Mariana García, Estefanía Mesa, Fiorella Scaglione, Pilar Alvez, and Martín Aguerre for their help during intensive blood sampling periods. The investigation that leads to the results presented on this publication was financial supported by the Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), FCE2007_541.

²Corresponding author: cfiof@yahoo.com

Received June 8, 2015.

Accepted December 6, 2015.

INTRODUCTION

To maximize lifetime productivity, early puberty of heifers is necessary in those animals that are bred to calve as 2-yr-old compared with 3-yr-old calving (Núñez-Dominguez et al., 1991; Patterson et al., 1992). Sociosexual signals stimulate reproductive activity in a wide variety of species (Signoret, 1991), and specifically, biostimulation (stimulation of females' cyclic activity with males) advances the onset of puberty in beef heifers (Roberson et al., 1991; Rekwot et al., 2000; Oliveira et al., 2009; Fiol et al., 2010). The

physiological mechanisms determining the female response to biostimulation are well documented in small ruminants, but information in cattle is scarce, with most studies performed in postpartum cows. Ewes and goats respond to the introduction of males with a rapid increase in LH secretion (Martin et al., 1983; Ungerfeld, 2003) that stimulates follicular growth (Atkinson and Williamson, 1985; Delgadillo et al., 2009) followed by ovulation 2 to 3 d later. Similarly, biostimulation induces increases in LH secretion in postpartum cows (Baruah and Kanchev, 1993; Fernandez et al., 1996; Roelofs et al., 2007; Tauck et al., 2010b), although some studies could not confirm this effect (Custer et al., 1990). In addition, the LH variables were differently affected in those studies. Positive effects have also been recorded in ovarian follicular diameter in biostimulated prepubertal heifers (Bastidas et al., 1997) and postpartum cows (Berardinelli et al., 2009), but there are too few studies to draw conclusions. We hypothesized that noncyclic heifers will respond to androgenized steers (AS) with an increase in their LH concentration and follicular diameter, thus advancing ovarian cyclic activity. Therefore, our objectives were to 1) characterize the LH concentration pattern and the follicular diameter of anestrus heifers during the first 30 d of exposure to AS and 2) determine if exposure to AS for 80 d advances the onset of ovarian cyclic activity.

MATERIALS AND METHODS

Animals, Housing, and Treatments

Animal care, handlings, and protocols were approved by the Comisión Honoraria de Experimentación Animal (Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay). The study was performed in the Campo Experimental number 1 of the Facultad de Veterinaria (34° S, 55° W) during August to November, with 29 anestrus Hereford heifers (mean age of 20.2 mo [SD 4.1] and mean BW of 257.5 kg [SD 32.5]) and 6 AS. Anestrus was confirmed in all the heifers by 2 consecutive ovarian scannings 14 and 7 d before the onset of the experiment. Heifers were allocated to 2 homogeneous groups according to their age and BW: 1) heifers exposed to AS (group **EH**; $n = 15$) and 2) control heifers, isolated from AS and any other male during all the course of the study (group **CH**; $n = 14$). All animals grazed native pastures in 2 paddocks (46.5- and 33.1-ha paddocks for groups EH and CH, respectively) separated more than 1,000 m from each other, so that the CH group could not see, hear, or smell the males. All the animals had free access to millet hay supplementation daily.

On d 0 at 1600 h, 3 adult Hereford AS (4 yr old and 390.0 ± 20.0 kg BW) were joined with the EH group. Steers received weekly doses of testosterone

propionate (600 mg intramuscular, Testosterone Ultra Fuerte; Dispert, Montevideo, Uruguay) from d -7 to 14, when they were removed and replaced with other 3 steers, which were treated weekly from Day 7 until the end of the exposure period (d 80). During the course of the exposure period, all AS displayed male sexual behavior (e.g., courtship behavior, flehmen).

Luteinizing Hormone Profile and Assay

Since 1 mo before the beginning of the experiment, 8 heifers per group were accustomed to individual stalls that were located in their respective paddocks and to the frequent blood-sampling procedure. The stalls had shade for the 8 heifers. During the habituation period, animals were moved to the proximity of the stalls (3 to 4 times per week) and were gradually introduced into them to minimize the stress during sampling. On d -10, 1, 10, 20, and 30 of the experiment, the 8 heifers/group were moved into the individual stalls for blood sampling. One hour before each blood-sampling period began, the animals were fitted with jugular vein catheters (14-gauge I.V. Straight Hub Radiopaque Catheter; Jelco, Smiths Medical, Latina Scalo, Italy), and 10 mL of blood were collected on dry tubes from each female every 15 min for 6 h (0800 to 1400 h). On d 1, the blood sampling procedure began 16 h after AS were joined with the EH. During the 6 h of the intensive blood-sampling period, the AS were maintained in the pen adjacent to the EH group. Blood samples were maintained at room temperature for 20 min and centrifuged at $3,000 \times g$ for 15 min at room temperature, and serum was stored at -20°C until assayed for LH concentration.

Luteinizing hormone concentrations were determined in duplicate aliquots of 200 μL with a double-antibody RIA using anti-bovine LH (Bolt and Rollins, 1983; Bolt et al., 1990), in the Universidade Estadual Paulista (Araçatuba, SP, Brazil). All samples were analyzed in 1 assay; the intra-assay CV were 4.23 and 8.55% for the low and high controls, respectively; and the minimum detection limit was 0.06 ng/mL.

Follicular Growth and Cyclic Activity

All heifers were weighed at the beginning (d -10) and at the end of the experiment (d 80). Estrous behavior was recorded twice daily (0700 and 1830 h) during 40 min by 2 experienced observers from d -10 to 30. Estrous behavior was considered when the animal was kept immobile while mounted (by a herd mate or AS in the EH group). During the same period (d -10 to 30), ovaries of each heifer were scanned daily to determine the number of follicles greater than 3 mm, the diameter (length \times width/2) of the greatest follicle (maximum

follicle diameter [MFD]), and the presence of a corpus luteum (CL) using an Aloka 500 (Aloka Medical Ltda, Tokyo, Japan) ultrasound scanner with a 5.0 MHz linear transducer. From then on, ovaries were scanned weekly from d 32 to 60 and on d 70 and 80 to determine the presence of CL. Ovarian scannings were performed in facilities located in the same paddock where each group of animals was allocated. In addition, to avoid the possible influences of odors remaining from AS in the researchers' clothes, ovarian scanning was always performed first in CH and then in EH. The onset of cyclic activity was considered as the day in which standing estrus was recorded followed by visualization of a CL or as the first date of 2 successive scans (separated by 7 or 10 d) in which a CL was observed in the same ovary.

Data Analysis

To characterize the LH pattern of each heifer, 4 variables were defined: mean LH concentration, baseline LH concentration, and frequency (pulses/6 h) and amplitude of LH pulses. The baseline was defined as the average of the 5 nadirs. The existence of an LH pulse was considered when the maximum concentration was (modified from Roelofs et al., 2007) 1) above the basal concentration + 2 SD, 2) over 0.2 ng/mL above the previous nadir, 3) above the previous sample, and 4) above the 2 subsequent samples involving at least 2 points. Amplitude was calculated by the difference between the pulse (at the highest concentration) and the basal concentrations. For statistical analysis, the mean value for LH pulse amplitude and frequency was first calculated for each heifer on each day.

To characterize the follicular development, the emergence of a follicular wave (FW), defined as the day when the dominant follicle of a wave was first recorded (3–4 mm in diameter), was retrospectively determined. Thereafter, the following variables were determined in each FW: MFD, days to reach the MFD, days to regression of the FW, and follicle growth rate (FGR). The time to reach the MFD was defined as the number of days between its emergence and the first day in which the increase in diameter stopped. The time to the regression of the FW was determined as number of days until the follicle disappeared after its progressive decrease in diameter (modified from Evans et al., 1994). The FGR (mm/d) was defined as the mean daily increase in follicular diameter between FW emergence and the day in which the follicle reached its maximum diameter. For statistical analysis, only data collected from waves entirely detected (growing, static, and regression phases) were used. The number of heifers that presented 3 FW was low (7/15 and 5/14 for EH and CH, respectively); therefore, only the first 2 FW were used for comparison

between groups. In relation to d 0, emergence of FW 1 was observed on d 2 (range = d –3 to 7) and emergence of FW 2 was observed on d 10 (range = 6 to 17 d).

Luteinizing hormone parameters and follicular variables of each FW were compared with PROC MIXED of SAS (SAS 9.0v; SAS Inst. Inc., Cary, NC). For LH parameters, we included the group (EH vs. CH), the day, and the interaction between group and day as main effects in the model, whereas the model for follicular parameters included as main effects the group (EH vs. CH), the number of FW (FW 1 or FW 2), and the interaction between group and FW. In both analysis, the heifer into each group was included as random effect and first-order autoregressive structure was used for repeated measurements within heifers. Tukey–Kramer tests were conducted to analyze differences between heifer groups and days and between heifer groups and FW. The number of FW for each group was analyzed with the GLM procedure of SAS. The accumulated frequency of cyclic heifers in each date was compared using a χ^2 test, and BW between groups was compared by an unpaired *t* test. Significant differences were considered when $P \leq 0.05$ and tendencies were considered as $0.05 < P \leq 0.1$. The results are presented as mean \pm SEM.

RESULTS

Luteinizing Hormone Secretion Pattern

Mean LH concentrations (1.45 ng/mL [SEM 0.05] for EH and 1.42 ng/mL [SEM 0.05] for CH) and basal LH concentrations (1.29 ng/mL [SEM 0.06] for EH and 1.26 ng/mL [SEM 0.06] for CH) did not differ between groups ($P > 0.05$) during the first 30 d of the exposure period. There was a day ($P < 0.0001$) and a group \times day ($P < 0.0001$) effect in both parameters. Mean and basal LH concentrations increased during the intensive sampling period: values were greater ($P < 0.05$) on d 20 (1.83 \pm 0.07 ng/mL) and 30 (1.65 \pm 0.07 ng/mL) than on d –10 (1.23 \pm 0.07 ng/mL), 1 (1.14 \pm 0.07 ng/mL), and 10 (1.28 \pm 0.07 ng/mL). On d 10, mean and basal LH concentrations were greater ($P < 0.001$) in the EH group than in the CH group; however, on d 30 of the exposure period, LH concentrations were greater ($P < 0.05$) in the CH group than in the EH group (Fig. 1).

No group or group \times day ($P > 0.05$) effects were observed in LH pulse amplitude (0.32 ng/mL [SEM 0.04] vs. 0.36 ng/mL [SEM 0.04] for EH vs. CH, respectively) and frequency (2.8 pulses/6 h [SEM 0.2] vs. 3.2 pulses/6 h [SEM 0.2] for EH vs. CH, respectively). There was a day effect on LH pulse amplitude: on d 20, LH pulse amplitude was greater compared with d –10, 1, and 10 ($P < 0.001$), whereas on d 30, it was greater ($P \leq 0.05$) than on d –10, 1, and 10. The

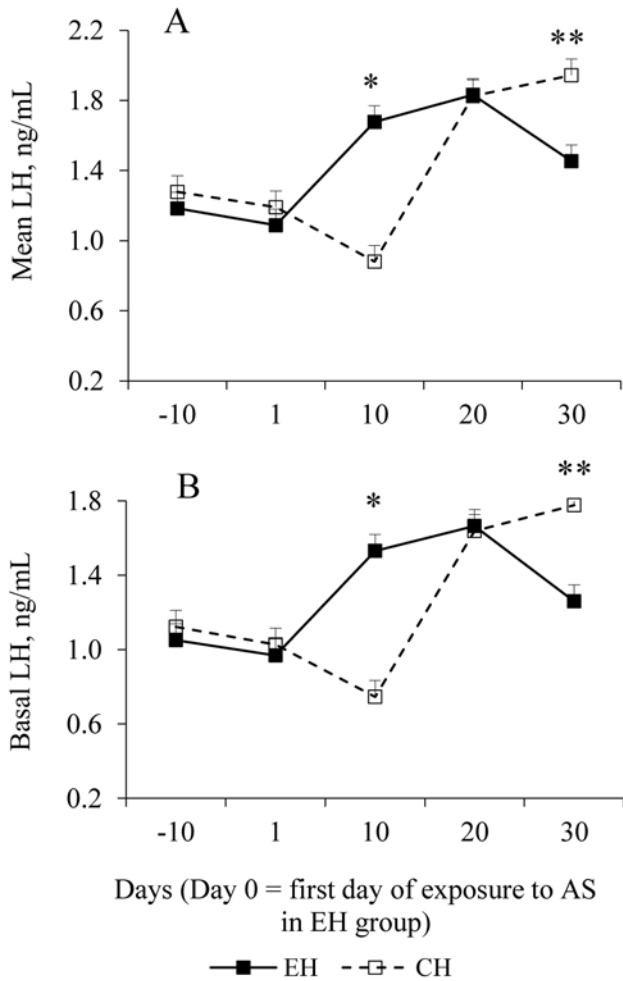


Figure 1. Luteinizing hormone concentration (mean \pm SEM), mean (panel A) and basal (panel B), in 20-mo-old anestrous beef heifers—either heifers exposed to androgenized steers (AS; EH; $n = 8$) or control heifers, isolated from androgenized steers and any other male during all the course of the study (CH; $n = 8$)—during 80 d. On Day 0, AS were joined to the EH group at 1600 h. Blood samples were taken every 15 min during 6 h (0800 to 1400 h) on d -10, 1, 10, 20, and 30. No group effect was found for mean ($P = 0.76$) and basal ($P = 0.67$) LH concentrations. Main effects of day and group \times day were $P < 0.001$ for both parameters. Days on which mean and basal LH differed between groups are indicated with $**P \leq 0.05$.

LH pulse frequency tended ($P = 0.07$) to change over time: it was greater ($P \leq 0.05$) on d 10 compared with d 1, 20, and 30 and tended ($P = 0.09$) to be greater than d -10.

Initial and final BW did not differ ($P > 0.05$) between the EH group (257.4 ± 8.4 and 274.7 ± 9.4 kg, respectively) and the CH group (257.6 ± 9.0 and 269.6 ± 9.2 kg, respectively).

Follicular Development and Onset of Ovarian Cyclic Activity

No differences ($P > 0.05$) were found on the number of FW between groups (2.46 [SEM 0.13] for EH vs. 2.35 [SEM 0.13] for CH). Biostimulated heifers (EH) reached a greater MFD (8.00 ± 0.16 mm) than

CH (7.52 ± 0.17 mm; $P = 0.05$). In addition, MFD increased ($P < 0.001$) from FW 1 to FW 2 and presented a group \times FW interaction ($P = 0.03$), explained by a greater MFD value in FW 2 in EH than in CH ($P = 0.03$), without differences in FW 1 (Table 1).

The time from follicular emergence to MFD tended to be greater ($P = 0.1$) in EH (8.8 ± 0.3 d) than in CH (8.0 ± 0.3 d). There was a treatment \times FW interaction ($P < 0.05$): EH needed more days to MFD in FW 2 compared with CH, without differences in FW 1 (Table 1). This variable was unaffected by FW number ($P > 0.05$). Time until regression of the FW tended ($P = 0.1$) to be greater in EH (11.8 ± 0.4 d) than in CH (10.8 ± 0.4 d) and was greater in FW 2 than in FW 1 (11.8 ± 0.4 vs. 10.7 ± 0.4 d; $P = 0.03$), with no group \times FW interaction ($P > 0.05$; Table 1).

The FGR was greater ($P < 0.05$) on FW 2 (1.02 ± 0.06 mm/d) compared with FW 1 (0.89 ± 0.03 mm/d), with no group effects or group \times FW interactions ($P > 0.05$; Table 1). Cumulative proportions of heifers that started cycling were greater in the EH group than in the CH group on d 60 (33.3% for EH vs. 0% for CH; $P = 0.01$), 70 (47% for EH vs. 0% for CH; $P < 0.005$), and 80 (53% for EH vs. 0% for CH; $P < 0.001$).

DISCUSSION

Biostimulation induced an increase in LH secretion (after 10 d of AS introduction) and in the follicular diameter (attained during the first 30 d of the exposure period) as well as advanced the onset of heifers' ovarian cyclic activity. To our knowledge, this is the first study reporting both the endocrine and ovarian response in anestrous heifers stimulated by the male effect. On the other hand, in previous studies in postpartum cattle, positive effects on mean LH secretion were observed earlier than in this study (Baruah and Kanchev, 1993; Fernandez et al., 1996; Roelofs et al., 2007). Baruah and Kanchev (1993) reported differences within 80 min after biostimulation started, whereas Fernandez et al. (1996) found greater mean LH concentrations 6 h after and Roelofs et al. (2007) 8 h after male exposure started, although in this last study, the difference was maintained for just 1 d. In our study, the first sample for LH was collected 16 h after AS introduction; therefore, it is possible that more acute effects were lost. However, the biostimulation effect should be delayed compared with the acute response reported in small ruminants (2–4 min; Martin et al., 1986), partly due to the low BW presented by these heifers at the beginning of the exposure period. In this sense, the response to the male effect may be related to the BW of the heifers at the beginning of the exposure period (Fiol et al., 2010). Moreover, it is possible that other factors, such as nutrition, environment,

Table 1. Follicle development in 20-mo-old anestrus beef heifers either exposed ($n = 15$) or isolated (control; $n = 14$) from androgenized steers during 80 d¹

Variable	Control heifers			Exposed heifers			<i>P</i> -value ²		
	FW1	FW2	SEM	FW1	FW2	SEM	Grp	FW	Grp × FW
MFD, ³ mm	7.3 ^a	7.7 ^a	0.20	7.5 ^a	8.5 ^b	0.19	0.05	<0.01	<0.05
Days to MFD ⁴	8.7 ^{ab}	7.3 ^b	0.47	8.5 ^{ab}	9.1 ^a	0.46	0.1	ns ⁵	<0.05
Days to REG ⁶	10.6	11.1	0.53	11.0	12.5	0.52	0.1	<0.05	ns
FGR, ⁷ mm/d	0.86	1.09	0.05	0.92	0.96	0.05	ns	<0.05	ns

^{a-b}Within a file, means without a common superscript differ ($P \leq 0.05$).

¹Each variable is presented for the first follicular wave (FW1) and second follicular wave (FW2) detected. Data were obtained by daily ovarian transrectal ultrasonography scannings during the first 30 d of the exposure to the males.

²Data was analyzed by PROC MIXED with group (Grp), follicular wave (FW), and Grp × FW as main effects. Tukey–Kramer tests were conducted to analyze differences between heifer group and FW.

³MFD = maximum follicle diameter.

⁴Days to reach the MFD: period between follicle emergence and the first day it appeared to stop its progressive increase in diameter.

⁵ns = no significant differences.

⁶Days to the regression (REG) of the FW: last day that the follicle appeared to stop its progressive decrease in diameter.

⁷FGR = follicle growth rate: mean daily increase in follicular diameter between first appearance as a 3 to 4 mm follicle and the day of maximum diameter.

and circadian rhythms (Ginther et al., 2013), influenced LH concentrations. In addition, other differences shall be noted between the present study and those performed in postpartum cows. The type of male stimulus was different: Baruah and Kanchev (1993) tested the oronasal treatment with bull urine, whereas Fernandez et al. (1996) exposed cows to continuous or intermittent (2 h every third day) contact with bulls for 18 d and Roelofs et al. (2007) used fence-line contact with bulls for only 8 h during 1 d. In any case, in some of those studies, mean and basal LH concentrations were also altered (Fernandez et al., 1996; Roelofs et al., 2007). Moreover, Tauck et al. (2010b) found an increase in LH pulsatility only for exposed cows compared with isolated cows but not with other cues. Overall, the lack of a consistent LH response may be due to the difference on the general responding pattern between small ruminants and cattle. Although the formers have a homogeneous and synchronized response (Ungerfeld et al., 2004), cows showed an advanced but dispersed ovulation (Ungerfeld, 2007; Fiol and Ungerfeld, 2012). Therefore, it may be possible that different species need different time lengths to display an LH response, and therefore, responses may be more dispersed, making more difficult to determine when the response is triggered in each individual.

The MFD was greater during the first 30 d in heifers exposed to males. This is consistent with our hypothesis and agrees with previous studies that reported positive effects on follicle growth after the introduction of males in prepubertal beef heifers (Bastidas et al., 1997) and postpartum anovular cows (Berardinelli et al., 2009). In addition, heifers exposed to males reached greater MFD during their second FW and follicles showed a greater sustained growth over time rather than regressing earlier. Similarly, Berardinelli et al. (2009) reported that

the MFD tended to be greater on FW 2 of postpartum anovular cows exposed to bulls compared with those isolated from males. In the present study, the second FW was probably the one that received the greater stimulus due to the presence of the males, as its emergence occurred within the first 6 to 17 d of exposure to AS, coinciding with the rise on LH concentrations observed on d 10 of the exposure period. Blood samples for LH were collected every 10 d, so we were not able to detect if differences on LH concentrations were also maintained from d 10 to 20. However, it is interesting to speculate that greater LH concentrations recorded on d 10 induced a sustained follicular growth during the second FW until the follicle reached a greater diameter in EH than in CH (Ginther et al., 2001, 2014). Moreover, in this experiment, biostimulation advanced the first ovulation, which is in agreement with previous experiments in peripubertal heifers (Roberson et al., 1991; Rekwot et al., 2000; Fiol et al., 2010) and cows during the postpartum period (Zalesky et al., 1984; Berardinelli and Joshi, 2005; Tauck et al., 2010a). In addition to the biostimulatory effect of the males, a “female–female effect” could have occurred at the moment that exposed females started to cycle, as previously reported (Fiol et al., 2010). Although exposed heifers presented greater LH concentrations on d 10 of male exposure and greater follicle diameter during the first 30 d of the exposure period, cyclic activity began only after 60 d of male exposure. Nutrition is one of the main factors that control the onset of puberty: both chronic and acute feed restriction determine negative effects on cyclic activity in prepubertal heifers (Day et al., 1986; Amstalden et al., 2000). Follicular development in heifers (Mackey et al., 1999; Bossis et al., 2000) and cows (Diskin et al., 2003) is negatively affected by both acute and chronic undernutrition. In the present

study, pasture availability was restricted, and millet hay supplementation was not enough to determine at least moderate rates of weight gain. In fact, mean BW gain for both groups ranged 0.1 to 0.2 kg/d, which is a very low BW gain for peripuberal growing heifers (Engelken, 2008). The mean MFD recorded during the first 30 d in our study was 8 mm, which implies a very low probability of ovulation (Forde et al., 2011; Diskin and Kenny, 2014). Therefore, it is possible to speculate that low nutritional status of the heifers during the experiment affected the LH response and, thus, the final growth of the dominant follicle and ovulation (Lents et al., 2013).

In conclusion, the presence of androgenized steers induced a transitory rise in LH secretion 10 d later and an increase on the greater follicular diameter during the first 30 d of the exposure period of anestrus beef heifers. Moreover, biostimulation anticipated cyclic activity in exposure females, but low nutritional restriction probably prevented an earlier response.

LITERATURE CITED

- Amstalden, M., M. R. Garcia, S. W. Williams, R. L. Stanko, S. E. Nizielski, C. D. Morrison, D. H. Keisler, and G. L. Williams. 2000. Leptin gene expression, circulating leptin, and luteinizing hormone pulsatility are acutely responsive to short-term fasting in prepubertal heifers: Relationships to circulating insulin and insulin-like growth factor I. *Biol. Reprod.* 63(1):127–133. doi:10.1095/biolreprod63.1.127.
- Atkinson, S., and P. Williamson. 1985. Ram-induced growth of ovarian follicles and gonadotrophin inhibition in anoestrous ewes. *J. Reprod. Fertil.* 73(1):185–189. doi:10.1530/jrf.0.0730185.
- Baruah, K. K., and L. N. Kanchev. 1993. Hormonal responses to olfactory stimulation with bull urine in postpartum dairy cows. In: *Proc. VII World Conf. Anim. Prod.*, Edmonton, AB, Canada. p. 356–359.
- Bastidas, P., J. Ruiz, M. Manzo, O. Silva, N. Guerrero, and J. Trocóniz. 1997. Effect of bull exposure on corpus luteum function and ovarian activity in prepuberal Brahman heifers. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 5(1):390–392.
- Berardinelli, J. G., and P. S. Joshi. 2005. Initiation of postpartum luteal function in primiparous restricted-suckled beef cows exposed to a bull or excretory products of bulls or cows. *J. Anim. Sci.* 83:2495–2500.
- Berardinelli, J. G., J. R. C. Wilkinson, S. A. Tauck, J. R. Olsen, and R. J. Wedlake. 2009. Duration of daily bull exposure on follicular wave dynamics of postpartum, anovular, suckled cows. *Biol. Reprod.* 81:544 (Abstr.).
- Bolt, D. J., and R. Rollins. 1983. Development and application of a radioimmunoassay for bovine follicle-stimulating hormone. *J. Anim. Sci.* 56(1):146–154.
- Bolt, D. J., V. Scott, and G. H. Kiracofe. 1990. Plasma LH and FSH after estradiol, norgestomet and Gn-RH treatment in ovarietomized beef heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 23(4):263–271. doi:10.1016/0378-4320(90)90040-M.
- Bossis, I., R. P. Wettemann, S. D. Welty, J. Vizcarra, and L. J. Spice. 2000. Nutritionally induced anovulation in beef heifers: Ovarian and endocrine function during realimentation and resumption of ovulation. *Biol. Reprod.* 62(5):1436–1444. doi:10.1095/biolreprod62.5.1436.
- Custer, E. E., J. G. Berardinelli, R. E. Short, M. Wehrman, and R. Adair. 1990. Postpartum interval to estrus and patterns of LH and progesterone in first-calf suckled beef cows exposed to mature bulls. *J. Anim. Sci.* 68:1370–1377.
- Day, M. L., K. Imakawa, D. D. Zalesky, R. J. Kittok, and J. E. Kinder. 1986. Effects of restriction of dietary energy intake during the prepubertal period on secretion of luteinizing hormone and responsiveness of the pituitary to luteinizing hormone-releasing hormone in heifers. *J. Anim. Sci.* 62:1641–1648.
- Delgado, J. A., H. Gelez, R. Ungerfeld, P. A. R. Hawken, and G. B. Martin. 2009. The ‘male effect’ in sheep and goats – Revisiting the dogmas. *Behav. Brain Res.* 200(2):304–314. doi:10.1016/j.bbr.2009.02.004.
- Diskin, M. G., and D. A. Kenny. 2014. Optimising reproductive performance of beef cows and replacement heifers. *Animal* 8(Suppl. s1):27–39. doi:10.1017/S175173111400086X.
- Diskin, M. G., D. R. Mackey, J. F. Roche, and J. M. Sreenan. 2003. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 78(3–4):345–370. doi:10.1016/S0378-4320(03)00099-X.
- Engelken, T. J. 2008. Developing replacement beef heifers. *Theriogenology* 70(3):569–572. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.05.032.
- Evans, A. C. O., G. P. Adams, and N. C. Rawlings. 1994. Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first ovulation in prepubertal heifers. *J. Reprod. Fertil.* 100(1):187–194. doi:10.1530/jrf.0.1000187.
- Fernandez, D. L., J. G. Berardinelli, R. E. Short, and R. Adair. 1996. Acute and chronic changes in luteinizing hormone secretion and postpartum interval to estrus in first-calf suckled beef cows exposed continuously or intermittently to mature bulls. *J. Anim. Sci.* 74:1098–1103.
- Fiol, C., G. Quintans, and R. Ungerfeld. 2010. Response to biostimulation in peri-puberal beef heifers: Influence of male-female proximity and heifer’s initial body weight. *Theriogenology* 74(4):569–575. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.03.015.
- Fiol, C., and Ungerfeld, R. 2012. Biostimulation in cattle: Stimulation pathways and mechanisms of response. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 15(Suppl. 1):S29–S45.
- Forde, N., M. E. Beltman, P. Lonergan, M. Diskin, J. F. Roche, and M. A. Crowe. 2011. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 124(3–4):163–169. doi:10.1016/j.anireprosci.2010.08.025.
- Ginther, O. J., D. R. Bergfelt, M. A. Beg, and K. Kot. 2001. Effect of LH on circulating oestradiol and follicular fluid factor concentrations during follicle deviation in cattle. *Reproduction* 122(1):103–110. doi:10.1530/rep.0.1220103.
- Ginther, O. J., F. L. V. Pinaffi, F. A. Khan, L. F. Duarte, and M. A. Beg. 2013. Circadian influence on the preovulatory LH surge, ovulation, and prolactin concentrations in heifers. *Theriogenology* 79(3):528–533. doi:10.1016/j.theriogenology.2012.11.003.
- Ginther, O. J., H. B. Rakesh, S. T. Bashir, and M. M. Hoffman. 2014. Minor FSH surge, minor follicular wave, and resurgence of preovulatory follicle several days before ovulation in heifers. *Theriogenology* 81(3):437–445. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.10.019.
- Lents, C. A., F. J. White, N. H. Ciccioli, L. N. Floyd-White, I. Rubio, D. H. Keisler, L. J. Spicer, and R. P. Wettemann. 2013. Metabolic status, gonadotropin secretion, and ovarian function during acute nutrient restriction of beef heifers. *J. Anim. Sci.* 91(9):4146–4157. doi:10.2527/jas.2013-6342.
- Mackey, D. R., J. M. Sreenan, J. F. Roche, and M. G. Diskin. 1999. Effect of acute nutritional restriction on incidence of anovulation and periovulatory estradiol and gonadotropin concentrations in beef heifers. *Biol. Reprod.* 61(6):1601–1607. doi:10.1095/biolreprod61.6.1601.

- Martin, G. B., C. M. Oldham, Y. Cognié, and D. T. Pearce. 1986. The physiological responses of anovulatory ewes to the introduction of rams – A review. *Livest. Prod. Sci.* 15(3):219–247. doi:10.1016/0301-6226(86)90031-X.
- Martin, G. B., R. J. Scaramuzzi, and D. R. Lindsay. 1983. Effect of the introduction of rams during the anoestrous season on the pulsatile secretion of LH in ovariectomized ewes. *J. Reprod. Fertil.* 67(1):47–55. doi:10.1530/jrf.0.0670047.
- Núñez-Dominguez, R., L. V. Cundiff, G. E. Dickerson, K. E. Gregory, and R. M. Koch. 1991. Lifetime production of beef heifers calving first at two vs. three years of age. *J. Anim. Sci.* 69:3467–3479.
- Oliveira, C. M. G., B. D. Oliveira Filho, M. L. Gambarini, M. A. O. Viu, D. T. Lopes, and A. P. F. Sousa. 2009. Effect of biostimulation and nutritional supplementation on pubertal age and pregnancy rates of Nelore heifers (*Bos indicus*) in a tropical environment. *Anim. Reprod. Sci.* 113(1–4):38–43. doi:10.1016/j.anireprosci.2008.08.006.
- Patterson, D. J., R. C. Perry, G. H. Kiracofe, R. A. Bellows, R. B. Staigmiller, and L. R. Corah. 1992. Management considerations in heifer development and puberty. *J. Anim. Sci.* 70:4018–4035.
- Rekwot, P. I., D. Ogwy, E. Oyedipe, and V. Sekoni. 2000. Effects of bull exposure and body growth on onset of puberty in Bunajii and Friesian × Bunajii heifers. *Reprod. Nutr. Dev.* 40(4):359–367. doi:10.1051/rnd:2000104.
- Roberson, M. S., M. W. Wolfe, T. T. Stumpf, L. A. Werth, A. S. Cupp, N. Kojima, P. L. Wolfe, and P. J. Kittok. 1991. Influence of growth rate and exposure to bulls on age at puberty in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 69:2092–2098.
- Roelofs, J. B., N. M. Soede, S. J. Dieleman, W. Voskamp-Harkema, and B. Kemp. 2007. The acute effect of bull presence on plasma profiles of luteinizing hormone in postpartum, anoestrous dairy cows. *Theriogenology* 68(6):902–907. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.07.003.
- Signoret, J. P. 1991. Sexual pheromones in the domestic sheep: Importance and limits in the regulation of reproductive physiology. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 39(4):639–645. doi:10.1016/0960-0760(91)90263-5.
- Tauck, S. A., J. R. Olsen, J. R. C. Wilkinson, and J. G. Berardinelli. 2010a. Duration of daily bull exposure on resumption of ovulatory activity in postpartum, primiparous, suckled, beef cows. *Anim. Reprod. Sci.* 118(1):13–18. doi:10.1016/j.anireprosci.2009.06.010.
- Tauck, S. A., J. R. Olsen, J. R. C. Wilkinson, R. J. Wedlake, K. C. Davis, and J. G. Berardinelli. 2010b. Characteristics of temporal patterns of cortisol and luteinizing hormone in primiparous, postpartum, anovular, suckled, beef cows exposed acutely to bulls. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 8(1):89. doi:10.1186/1477-7827-8-89.
- Ungerfeld, R. 2003. The reproductive response of anoestrous ewes to the introduction of rams. PhD Diss., Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- Ungerfeld, R. 2007. Socio-sexual signaling and gonadal function: Opportunities for reproductive management in domestic ruminants. In: J. I. Juengel, J. F. Murray, and M. F. Smith, editors, *Reproduction in domestic ruminants VI*. Nottingham Univ. Press, Nottingham, UK. p. 207–221.
- Ungerfeld, R., M. Forsberg, and E. Rubianes. 2004. Overview of the response of anoestrous ewes to the ram effect. *Reprod. Fertil. Dev.* 16(4):479–490. doi:10.1071/RD04039.
- Zalesky, D. D., M. L. Day, M. Garcia Winder, K. Imakawa, R. J. Kittok, M. J. D’Occhio, and J. E. Kinder. 1984. Influence of exposure to bulls on resumption of estrous cycles following parturition in beef cows. *J. Anim. Sci.* 59:1135–1139.



Social dominance in prepubertal dairy heifers allocated in continuous competitive dyads: Effects on body growth, metabolic status, and reproductive development

C. Fiol,^{*1} M. Carrquiry,[†] and R. Ungerfeld[‡]

^{*}Departamento de Bovinos, Instituto de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Ruta 1 km 42.5, 80100, San José, Uruguay

[†]Departamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Av. E. Garzón 780, 12900, Montevideo, Uruguay

[‡]Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Lasplacas 1550, 11600, Montevideo, Uruguay

ABSTRACT

The objective of this study was to compare the body weight (BW) and size, metabolic status, and reproductive development of dominant and subordinate prepubertal dairy heifers allocated in competitive dyads. Sixteen Holstein and Jersey × Holstein prepubertal heifers (means ± SEM; 250.8 ± 9.8 d; 208.5 ± 13.9 kg of BW) were assigned to 8 homogeneous dyads according to breed, age, and BW. Dyads were housed in pens separated 1 m from each other during 120 d, receiving a total mixed ration on a 5% restriction of their potential dry matter intake, and had access to the same feeder (60 cm) throughout the experiment. Dominant and subordinate heifers were defined based on the winning agonistic interactions in each dyad. Body development was recorded every 20 d in all heifers, and blood samples were collected on the same days to determine endocrine and metabolic status. The maximum follicle diameter, number of follicles >6 mm, and the presence of corpus luteum were observed weekly by ultrasound. Heifer BW (269.3 vs. 265.3 ± 1.5 kg) and average daily gains (0.858 vs. 0.770 ± 0.02 kg/d) were greater in dominant than subordinate heifers. On d 30, 37, and 53, dominant heifers had more follicles than subordinate heifers, and maximum follicle diameter was greater in dominant than in subordinate heifers (10.0 vs. 9.0 ± 0.3 mm). Dominant heifers achieved puberty earlier than subordinate heifers (313.9 ± 4.9 vs. 329.6 ± 5.7 d) with similar BW (279.4 ± 2.6 vs. 277.4 ± 5.8 kg). Glucose concentrations were greater in dominant than subordinate heifers (89.2 vs. 86.8 ± 1.2 mg/dL), but cholesterol concentrations were greater in subor-

dinate than dominant heifers (86.1 vs. 90.2 ± 2.6 mg/dL). We concluded that, under continuous competitive situations, dominant heifers were more precocious than subordinate ones, achieving an earlier puberty. Dominant heifers had greater body growth and glucose concentrations than subordinate heifers, which may be responsible, at least in part, for the differences on reproductive development between heifers of different social status.

Key words: replacement heifer, social behavior, social hierarchy, puberty

INTRODUCTION

Raising replacement heifers for dairy farms is expensive; thus, any increase in efficiency during this period has important consequences in reducing costs (Tozer and Heinrichs, 2001). Although age at first calving is one of the main determinants of productive success (Abeni et al., 2000; Pirlo et al., 2000), BW at calving and rate of growth before puberty can affect the maximum milk produced in the first lactation (Zanton and Heinrichs, 2005). In Uruguay, most dairy farmers maintain their heifers on low-quality pastures, which has been shown to increase age at first calving (36 mo; Conaprole, 2008) compared with the recommended 24 mo (Heinrichs and Swartz, 1990). In this context, intensive feeding systems, in which heifers are fed a TMR, are an important management tool to improve dairy heifer-rearing programs. Under these systems, social dominance and competition for feed may influence access to food and thus, heifer growth (DeVries, 2010). Management practices that involve high competition levels for feeding are major stressors that may have a negative effect on access to food and growth, raising welfare concerns, and thus, the need to develop alternative management.

Social dominance, the relationship of dominance–subordination established between 2 individuals (Drews,

Received August 6, 2016.

Accepted November 15, 2016.

¹Corresponding author: cfiolepera@gmail.com

1993), has direct consequences on productive and reproductive results. Milk yield and fertility of dairy cows increased with social rank (Dobson and Smith, 2000; Phillips and Rind, 2002; Val-Laillet et al., 2008) and high-ranked beef cows were rebred earlier during the postpartum period compared with low-ranked cows (Landaeta-Hernández et al., 2013). In growing animals, high-ranked male lambs had greater ADG and a precocious increase of scrotal circumference, semen production, and sexual behavior compared with low-ranked lambs (Ungerfeld and González-Pensado, 2008). The effects of social dominance on an animal's performance may be exacerbated by management conditions that determine increased competition for resources (reduced feeding space or overstocking on intensive feeding systems; Val-Laillet et al., 2008; Manteca, 2009). Great levels of competition between heifers at the feedbunk provoked greater variability in ADG (Longenbach et al., 1999; González et al., 2008), whereas other studies suggested that high-ranked heifers gained more BW than low-ranked heifers (Greter et al., 2010).

Metabolic status in prepubertal heifers is affected by multiple factors, especially, nutrition and growth rate (Abeni et al., 2000, 2012). Depending on nutritional levels, Holstein and Jersey heifers can reach puberty at

280 to 360 and 330 to 390 d, respectively (Stewart et al., 1980). Although BW gain, age, and breed are directly related to the onset of ovarian cyclic activity, many metabolic hormones and metabolites are important signals for follicular development and initiation of puberty (Yelich et al., 1995, 1996; Chelikani et al., 2003). Therefore, it is expected that any alteration of heifer nutritional status (such as that provoked by high competition rates due to dominance status) may determine changes in growth rate, and thus, affect metabolite and endocrine profile and reproductive development.

We hypothesized that in heifers allocated continuously in competitive dyads (1) dominant heifers have greater body growth rate and follicle size and achieve puberty earlier than subordinate heifers, and (2) dominant heifers present a metabolic and endocrine profile that reflect a "more positive" energy balance (greater serum insulin, IGF-I, glucose, cholesterol, and urea) than subordinate heifers. Therefore, the objective of the present study was to compare BW and size, metabolic status, and reproductive development of dominant and subordinate prepubertal dairy heifers allocated in competitive dyads.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Housing

Animal care, handling, and protocols were approved by the Comisión Honoraria de Experimentación Animal (Universidad de la República, Uruguay). The study was performed in the Campo Experimental number 2 of the Facultad de Veterinaria, San José, Uruguay (34°40'S, 56°32'W) from October to March. Sixteen Holstein ($n = 12$) and Jersey \times Holstein ($n = 4$) prepubertal heifers (250.8 ± 9.8 d; 208.5 ± 13.9 kg of BW; mean \pm SEM), that were managed similarly before the study, were selected from the herd of the experimental farm and were allocated to 8 homogeneous dyads, according to breed, age, and BW.

Each dyad was allocated for 120 d in shed pens (5 \times 8 m) separated (1 m) by electrical fences from the adjacent pen to avoid physical contact with animals from the other dyads. Heifers were fed a TMR composed of ground corn grain, soybean meal, corn or pasture silage, and a commercial premix [calcium carbonate, magnesium oxide, sodium bicarbonate, Rumensin (Elanco Animal Health, Indianapolis, IN), salt, yeasts], with a 60:40 forage to concentrate ratio. On d 46 of the study, due to availability, corn silage was substituted by pasture silage (Table 1). The TMR was formulated to a target gain of 800 g/d of BW according to NRC (2001), and with the recommended MP to ME ratio so

Table 1. Composition and nutritive value (% unless otherwise noted; mean \pm SD) of the TMR¹ (on DM basis) fed to prepubertal dairy heifers in 2 experimental periods

Item	Experimental period	
	d 1 to 46	d 47 to 120
Ingredient		
Corn silage	58.3	—
Pasture silage	—	59.3
Ground corn grain	28	32
Soybean meal	12.6	7.6
Urea	0.5	0.5
Commercial premix ²	0.5	0.5
Chemical composition		
DM	30.3 \pm 1.3	57.1 \pm 2.6
Ash	7.0 \pm 0.2	11.3 \pm 1.9
CP	14.2 \pm 0.6	13.8 \pm 2.8
ADF	27.4 \pm 2.8	20.1 \pm 1.3
NDF	50.7 \pm 4.6	35.1 \pm 5.9
Ether extract	2.6 \pm 0.2	2.4 \pm 0.4
ME ³ (Mcal/kg)	2.37	2.46
CP:ME (g/Mcal)	60.0	59.1

¹Diet was formulated for 0.800 kg/d of ADG (NRC, 2001).

²One hundred grams contained 0.8 g of Rumensin (Elanco Animal Health, Indianapolis, IN), 20 g of calcium carbonate, 5 g of mineral and vitamin premix, 7 g of MgO, 36 g of sodium bicarbonate, 2 g of Procreatin 7 (Philips Lesaffé Animal Care, Lyon France), 5 g of salt, 3 g of Safmannan (Philips Lesaffé Animal Care), and 21.2 g of wheat bran.

³Estimated according to the NRC (2001).

as to not alter mammary gland development (Albino et al., 2015). Ration and silage were mixed every day at 0700 h and offered once daily to each dyad between 0730 and 0830 h.

Heifers had an initial adaptation period of 20 d (total study period = 140 d), in which they were allocated in dyads and acclimated to the experimental conditions. In addition, during the adaptation period, the potential DMI of each dyad was determined by weighing the TMR offered and refused each day. The potential DMI was considered when <3%orts was left for at least 3 consecutive days. Afterward, and to maximize competition between heifers, the amount offered to each dyad was restricted by 5%. Each dyad had access to the same feeder (60 cm) throughout the experiment. The amount of feed offered was adjusted after each time heifers were weighed (considering the mean BW of each dyad). Water was available ad libitum in 2 water bowls/pen. During half of the study (60 d), mean temperatures were >23°C (range: 22–31°C) and the temperature-humidity index was >72 (range: 72 to 86; INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay), which corresponded to mild to moderate levels of heat stress (Dash et al., 2016).

Social Dominance Determination

The dominant and subordinate heifer in each dyad were determined by observing agonistic interactions in each dyad for 15 min at the moment the TMR was delivered on d 0 (after the adaptation period), 2 more times in the first month of the experiment, and every month afterward. Agonistic interactions included the following: fighting (animals head to head and pushing each other), butting (violent contact of the head on the body of the other animal), threatening (same movement as butting but without contact), and flight (animal turning the head or moving away when another approaches without threat or butt). The animal that performed more winning interactions was determined as dominant, and the other animal was the subordinate.

Body Growth

Body weight, BCS, heart girth (**HG**), withers height (**WH**), and rump fat thickness (**RFT**) were measured every 20 d in all the heifers. Heifers were weighed in the morning, before the TMR was supplied, using a portable electronic scale. The ADG (kg/d) was calculated as the ratio of weight difference between each BW and days. Body condition score was determined by visual observation using a scale adapted for heifers (range 1 to 5; Heinrichs and Jones, 2016) by the same observer. The HG was determined with an inelastic measuring

tape placed just behind the front legs and behind the shoulders of the heifer. When measuring WH, the animal was held on a level surface and a ruler was placed next to the forelegs. A level was used to ensure that the adjustable part (on the heifer's withers) was parallel to the floor when the highest point of the withers was measured (the high point of the back located at the base of the neck and between the shoulder blades). The RFT (the subcutaneous fat layer located between the skin and the *fascia trunci profunda* above the *gluteus medius* and the *biceps femoris* muscles) was measured by ultrasound (Ayres et al., 2009). After animal immobilization, a 5.0-MHz linear transducer (Aloka 500, Aloka Medical Ltd., Tokyo, Japan) was located linearly between hooks and pins at the sacral examination site and moved until the correct image was viewed, allowing the operator to distinguish the superior limit of biceps femoris muscle. The distance between the inferior limit of skin and the *fascia trunci profunda* was measured, excluding the skin thickness.

Reproductive Development

At the beginning of the experiment, anestrus was determined in all heifers by 2 consecutive ovarian scans 7 d apart. Thereafter, starting on d 0, ovarian scans were performed weekly in all heifers using an Aloka 500 (Aloka Medical Ltd.) ultrasound scanner with a 5.0-MHz linear transducer. In each scan, the diameter of the greatest follicle (maximum follicle diameter, **MFD**), number of follicles >6 mm, and the presence of corpus luteum were recorded. The onset of puberty was considered the first date of 2 successive scans (separated by 7 d) in which a corpus luteum was observed in the same ovary. Ovarian scanning ended when each heifer achieved puberty.

Metabolic Hormones and Metabolites

Blood samples were collected every 20 d from coccygeal vein before feeding, in 2 tubes, one dry, and another with sodium citrate (to determine glycemia). Samples were centrifuged ($3,000 \times g$ for 15 min at 4°C) within 2 h after collection, and serum was stored at -20°C until measurements were performed. Insulin concentrations were quantified by an immunoradiometric assay (DIASource ImmunoAssays S.A., Louvain-la-Neuve, Belgium). The sensitivity of the assay was 1 μ IU/mL; intraassay coefficient of variation (**CV**) for low (22.8 μ IU/mL) and high (89.5 μ IU/mL) controls was 10 and 7.5%, respectively. Concentrations of IGF-I were quantified by RIA (Cisbio Bioassays, Codolet, France). The sensitivity of the assay was 1 ng/mL; intraassay

Table 2. Body growth parameters in dominant ($n = 8$) and subordinate ($n = 8$) prepubertal dairy heifers maintained under competitive situations over 120 d; heifers were allocated in dyads and received a TMR daily

Item	Group		SEM	P-value		
	Dominant	Subordinate		Group	Day	Group \times day
BW (kg)	269.3	265.3	1.50	0.04	<0.05	0.4
ADG (kg/d)	0.858	0.770	0.02	0.03	<0.05	0.5
BCS	3.02	3.06	0.04	0.2	<0.05	0.08
Heart girth (cm)	152.5	152.2	0.80	0.7	<0.05	0.1
Withers height (cm)	112.6	112.6	2.00	0.9	<0.05	0.6
Rump fat thickness (mm)	0.75	0.74	0.06	0.5	<0.05	0.9

CV was 3.3 and 19% for low (39.7 ng/mL) and high (397.4 ng/mL) controls, respectively. Both the insulin and IGF-I assays were previously used in bovines (Assessiano et al., 2015). Glucose, cholesterol, and urea concentrations were determined spectrophotometrically (Vitalab, Selectra 2 autoanalyzer; Vital Scientific, Dieren, the Netherlands) using commercial enzymatic kits (Wiener Lab Group, Rosario, Argentina). All samples were determined in the same assay for each metabolite, and quality assurance was provided by including internal quality controls in each assay.

TMR Chemical Analysis

Samples of TMR were collected at d 17, 78, and 112 of the experiment during 5 consecutive days. Individual samples were composited and analyzed for DM, ash, total N, and ether extract (AOAC, 1990; methods 934.01, 942.05, 955.04, and 920.39, respectively), and for NDF and ADF (sequentially using a thermostable α -amylase and sodium sulfite; Van Soest et al., 1991).

Statistical Analysis

Data were analyzed in a randomized block design using SAS software (SAS Institute Inc., Cary, NC). Body growth, follicular development, and metabolic and endocrine profile data were analyzed as repeated measures using PROC MIXED, with day as the repeated effect, spatial power law (for unevenly spaced data) as the covariance structure, and the Kenward-Roger procedure to adjust the degree of freedom. Heifer was the experimental unit. The model included the fixed effects of the group (dominant and subordinate), the day of the experiment, and their interaction as main effects, and dyad and animal as random effects. The heifers' birth date was included in the model as co-variable if $P < 0.2$. Age and BW at puberty and the day of the experiment on which heifers began cycling were compared by paired t -test. Significant differences were considered

when $P \leq 0.05$ and tendencies as $0.05 < P \leq 0.1$. The results are presented as mean \pm SEM.

RESULTS

All recordings of body growth (BW, BCS, HG, WH, and RFT) increased during the experimental period ($P < 0.05$) in both groups of heifers. Heifer BW and ADG along the study were greater in dominant than in subordinate heifers ($P < 0.05$), with no interaction between group and day (Table 2). Social dominance did not influence heifer BCS, HG, WH, or RFT (Table 2).

The total number of follicles did not differ between groups (Table 3) but there was a tendency ($P = 0.10$) for an interaction between group and day: on d 30 ($P = 0.10$), 37 ($P = 0.01$), and 53 ($P = 0.07$) dominant heifers had more follicles than subordinate heifers, whereas on d 70, subordinate heifers tended to have more follicles than dominant heifers ($P = 0.06$; Figure 1). The MFD was greater in dominant than in subordinate heifers (Table 3) and tended to differ between days ($P = 0.07$), with no interaction between group and day. The number of follicles >6 mm differed between days ($P < 0.05$), with no group effect or interaction between group and day. Dominant heifers achieved puberty earlier than subordinate heifers ($P = 0.01$) but without differences in BW (Table 3). Dominant heifers tended to begin their cyclic activity (puberty) earlier in the experiment than subordinate heifers [70.3 ± 7.4 (range = 45–97) and 84.0 ± 3.8 (range = 70–97), respectively ($P = 0.06$)]. Those days of the experiment correspond to the age of heifers at puberty in each group (Table 3).

Insulin and IGF-I concentrations did not differ between groups (Table 4) but differed throughout the experiment with no interaction between group and day. Dominant heifers had greater glucose concentrations than subordinate heifers ($P = 0.01$), whereas subordinate heifers had greater cholesterol concentrations than dominant heifers ($P = 0.02$; Table 4 and Figure 2). In contrast, urea concentrations did not differ between

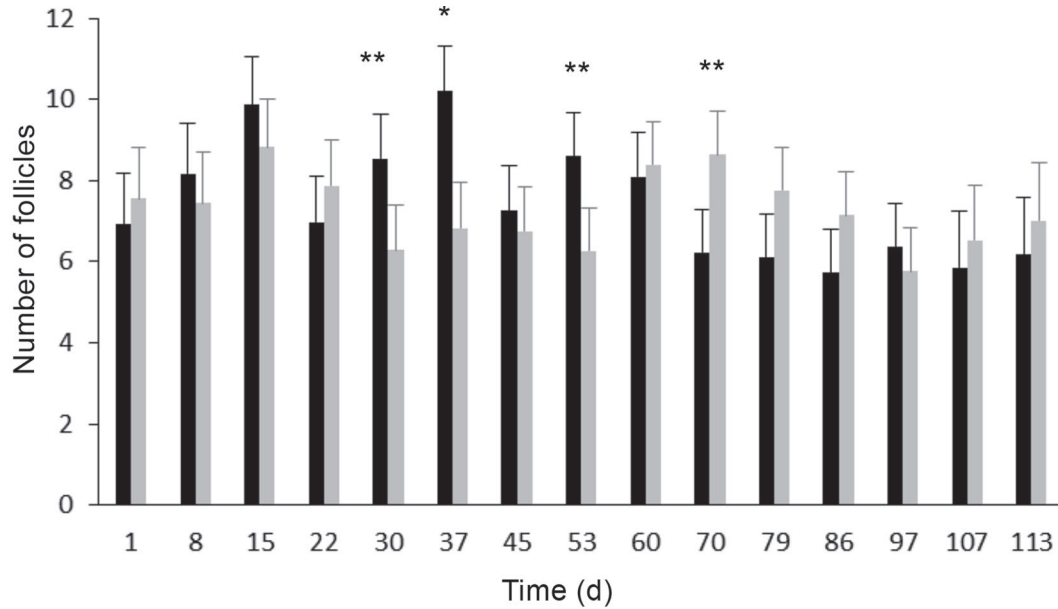


Figure 1. Total number of ovarian follicles in dominant (n = 8; black bars) and subordinate (n = 8; gray bars) prepubertal dairy heifers maintained in competitive situations over 120 d. Heifers were allocated in dyads and received a TMR daily. Asterisks at each day indicate difference among the groups: **P* < 0.05; **0.05 < *P* ≤ 0.1. Error bars represent SEM.

groups (Table 4). There was no interaction between group and day for any metabolite.

DISCUSSION

According to our knowledge, this is the first study demonstrating that social dominance in heifers maintained under continuous competitive situations directly affects their reproductive development, body growth, and some metabolic parameters. An earlier puberty is associated with increased size of the dominant follicle in beef heifers (Bergfeld et al., 1994), and dominant heifers had greater MFD throughout the study and more follicles than subordinate heifers from d 30 to 53, which corresponded to the period immediately before the onset of cyclic activity (d 45–50). The age at puberty was consistent with that in other studies in which dairy

heifers achieved similar growth rates (Chelikani et al., 2003; Davis Rincker et al., 2011), including de Trinidad (2014), who worked in similar local conditions. Body weight at puberty did not differ between dominant and subordinate heifers, which agrees with studies reporting that puberty occurs at a regular BW and body composition, independent of dietary manipulation (Chelikani et al., 2003). Thus, management conditions and heifers’ social status during the rearing period could be associated with reproductive development and performance at first breeding. Considering that the fertility of heifers increases if they have more cycles before breeding (Byerley et al., 1987), age at puberty directly affects pregnancy rates at first service, especially when heifers are bred to calve at 24 mo of age (Perry, 2012). Therefore, better fertility of dominant heifers than subordinate heifers may be expected at first service,

Table 3. Reproductive development in dominant (n = 8) and subordinate (n = 8) prepubertal dairy heifers maintained under competitive situations over 120 d; heifers were allocated in dyads and received a TMR daily

Item	Group			P-value		
	Dominant	Subordinate	SEM	Group	Day	Group × Day
Total no. of follicles	7.4	7.2	0.70	0.8	0.07	0.1
MFD ¹ (mm)	10.0	9.0	0.30	0.05	0.07	0.5
No. of follicles >6 mm	1.7	1.9	0.10	0.2	<0.05	0.2
Age at puberty (d ± SEM)	313.9 ± 4.9	329.6 ± 5.7	—	0.01	—	—
BW at puberty (kg ± SEM)	279.4 ± 2.6	277.1 ± 5.8	—	0.7	—	—

¹Maximum follicle diameter.

Table 4. Hormones and metabolites concentrations¹ in dominant (n = 8) and subordinate (n = 8) prepubertal dairy heifers maintained under competitive situations over 120 d; heifers were allocated in dyads and received a TMR daily

Item	Group		SEM	P-value		
	Dominant	Subordinate		Group	Day	Group × Day
Insulin (μIU/mL)	22.4	21.3	1.50	0.6	<0.05	0.1
IGF-I (ng/mL)	364.3	371.7	12.7	0.7	<0.05	0.9
Glucose (mg/dL)	89.2	86.8	1.20	0.01	<0.05	0.3
Cholesterol (mg/dL)	86.1	90.2	2.60	0.02	<0.05	0.6
Urea (mg/dL)	23.3	22.4	0.70	0.4	<0.05	0.8

¹Blood samples were taken every 20 d.

especially if they are going to be bred at 15 mo of age. Further long-term studies are needed to confirm this hypothesis.

Follicular development (Mackey et al., 1999; Bossis et al., 2000) and onset of puberty in heifers (Schillo et al., 1992; Funston et al., 2012; Perry, 2012) are directly related to nutritional status and thus, to changes in metabolic profile. Age at puberty is highly related to prepubertal ADG, both in beef and dairy heifers: greater

nutritional status and ADG hasten the onset of cyclic activity (Amstalden et al., 2000; Chelikani et al., 2003). Dominant heifers had greater ADG than subordinate heifers, which is in agreement with larger dominant follicles at a younger age in dominant compared with subordinate heifers (Bergfeld et al., 1994; Chelikani et al., 2003). Although the exact role of glucose in the reproductive function of female ruminants is still not fully elucidated (Haldar and Prakash, 2007; Sabia et al., 2014), greater ADG and follicular growth rates are associated with increased concentrations of glucose in prepubertal dairy heifers (Abeni et al., 2000), possibly indicating a “more positive” energy status in dominant heifers that results in greater follicular development compared with subordinate heifers. Moreover, greater glucose concentrations in dominant compared with subordinate heifers can be associated with a lower age at first breeding (Brickell et al., 2009). Previous studies reported that when competition for food increases, changes in feeding behavior, but not total DMI, affect heifers’ body growth (Longenbach et al., 1999; González et al., 2008; DeVries, 2010). In this sense, we might speculate that the greater opportunity for sorting by dominant heifers could determine that they were more efficient than subordinate heifers in selecting small particles such ground corn grain in the TMR (DeVries et al., 2005; Greter et al., 2008; Ceacero et al., 2012). Thus, dominant heifers probably consumed a more energetic diet (containing more corn grain), leading to greater ruminal propionate production, and thus increased serum glucose concentrations compared with subordinate heifers (Wiltrout and Satter, 1972). Therefore, changes in feeding behavior, food utilization, or both between heifers of different social status determined increased ADG and glucose concentrations in dominant compared with subordinate heifers, which ultimately affected their reproductive performance. Considering these results, management conditions that determined high levels of competition could lead not only to differences in ADG and BW between animals of different social status, but also to differences in

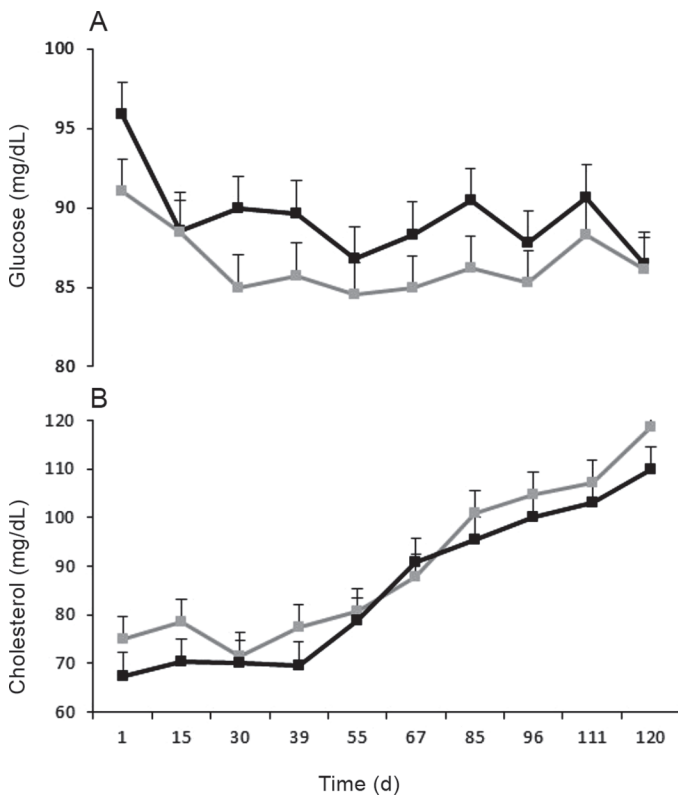


Figure 2. Concentrations of (A) glucose and (B) cholesterol in dominant (n = 8; black lines) and subordinate (n = 8; gray lines) prepubertal dairy heifers maintained in competitive situations over 120 d. Heifers were allocated in dyads and received a TMR daily. In both metabolites, we detected a group effect ($P < 0.05$). Error bars represent SEM.

metabolic status and reproductive performance. In this sense, the animals' housing (increase feeding space, do not overstock) becomes very important to decrease competition levels, and thus welfare concerns, in heifer-rearing systems.

The greater cholesterol concentrations observed in subordinate than in dominant heifers was not expected because, like glucose, cholesterol is positively related to energy status (McShane et al., 1989) and to ovarian function (Talavera et al., 1985). Cholesterol uptake is the main source for the synthesis of steroid hormones (Yart et al., 2014), and plasma progesterone concentrations are negatively correlated with plasma cholesterol concentrations (Talavera et al., 1985). Thus, as progesterone increases when cyclic activity begins, lower cholesterol levels in dominant heifers could be associated with their earlier puberty compared with subordinate heifers (Rodríguez-Sánchez et al., 2015). A different explanation could be related to the environmental conditions: during an important period of the study, heifers were under heat stress (temperature-humidity index >72; Dash et al., 2016), and it has been reported that cholesterol concentrations are greater in animals that suffer more heat stress (Scharf et al., 2010). As social rank can influence the response to specific stressors (Sutherland et al., 2007), subordinate heifers could be more affected by heat stress than dominant heifers, resulting in increased cholesterol levels. In addition, heat-stressed animals have lower glucose concentrations (Shaffer et al., 1981; Nonaka et al., 2008), as seen in the subordinate heifers in our study. Stress involves the reaction of an animal to harsh environments and it has unfavorable consequences in animal performance (Das et al., 2016). In this sense, heat stress affects reproductive performance in cattle (Dash et al., 2016); thus, the greater heat stress in subordinate heifers could have affected follicular development and increased age at puberty compared with dominant heifers.

CONCLUSIONS

Under continuous competitive situations, dominant heifers were more precocious than subordinate ones, achieving an earlier puberty. Dominant heifers had greater body growth and glucose concentrations than subordinate heifers, which may be responsible, at least in part, for the differences in reproductive development between heifers of different social status.

ACKNOWLEDGMENTS

We are especially grateful to Martin Aguerre, Ma. Noel Méndez, Augusto Lacava, Ignacio Donadio, Annie

dos Santos, Leticia Eustathiou, Ana Maverino, Guillermo Matto, Verónica Sánchez, Francisco Triay, and Federico de León (Facultad de Veterinaria, Uruguay) for their help with animal management. We also thank Maximiliano Pastorini, Gustavo Cazard, Damián Sosa, Elena de Torres (director of the Campo Experimental), Ana Laura Astessiano, and Alberto Casal (Facultad de Agronomía, Uruguay) for their help on hormone analysis, and Laura Pereira de Souza (Columbia University, New York, NY) for language revision. This study was financially supported by Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC VUSP_45), Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

REFERENCES

- Abeni, F., L. Calamari, L. Stefanini, and G. Pirlo. 2000. Effects of daily gain in pre- and postpubertal replacement dairy heifers on body condition score, body size, metabolic profile, and future milk production. *J. Dairy Sci.* 83:1468–1478.
- Abeni, F., L. Calamari, L. Stefanini, and G. Pirlo. 2012. Effect of average daily gain on body size, metabolism, and milk production of Italian Holstein heifers raised on two different planes of nutrition and calving at two different ages. *Livest. Sci.* 149:7–17. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2012.06.003>.
- Albino, R. L., M. I. Marcondes, R. M. Akers, E. Detmann, B. C. Carvalho, and T. E. Silva. 2015. Mammary gland development of dairy heifers fed diets containing increasing levels of metabolizable protein:metabolizable energy. *J. Dairy Res.* 82:113–120.
- Amstalden, M., M. R. Garcia, S. W. Williams, R. L. Stanko, S. E. Nizielski, C. D. Morrison, D. H. Keisler, and G. L. Williams. 2000. Leptin gene expression, circulating leptin, and luteinizing hormone pulsatility are acutely responsive to short-term fasting in prepubertal heifers: Relationships to circulating insulin and insulin-like growth factor I. *Biol. Reprod.* 63:127–133.
- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. AOAC, Arlington, VA.
- Astessiano, A. L., A. Meikle, M. Fajardo, J. Gil, D. A. Mattiauda, P. Chilibroste, and M. Carriquiry. 2015. Metabolic and endocrine profiles and hepatic gene expression of Holstein cows fed total mixed ration or pasture with different grazing strategies during early lactation. *Acta Vet. Scand.* 57:70–82. <https://doi.org/10.1186/s13028-015-0163-6>.
- Ayres, H., R. Machado Ferreira, J. R. de Souza Torres-Júnior, C. G. Borges Demétrio, C. Gonçalves de Lima, and P. S. Baruselli. 2009. Validation of body condition score as a predictor of subcutaneous fat in Nelore (*Bos indicus*) cows. *Livest. Sci.* 123:175–179. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2008.11.004>.
- Bergfeld, E. G. M., F. N. Kojima, A. S. Cupp, M. E. Wehrman, K. E. Peters, M. Garcia-Winder, and J. E. Kinder. 1994. Ovarian follicular development in prepubertal heifers is influenced by level of dietary energy intake. *Biol. Reprod.* 51:1051–1057.
- Bossis, I., R. P. Wettemann, S. D. Welty, J. Vizcarra, and L. J. Spicer. 2000. Nutritionally induced anovulation in beef heifers: Ovarian and endocrine function during realimentation and resumption of ovulation. *Biol. Reprod.* 62:1436–1444.
- Brickell, J. S., M. M. McGowan, and D. C. Wathes. 2009. Effect of management factors and blood metabolites during the rearing period on growth in dairy heifers on UK farms. *Domest. Anim. Endocrinol.* 36:67–81. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2008.10.005>.
- Byerley, D. J., R. B. Staigmillet, J. G. Berardinelli, and R. E. Short. 1987. Pregnancy rates of beef heifers bred either on puberal or third estrus. *J. Anim. Sci.* 65:645–650.
- Ceacero, F., A. J. García, T. Landete-Castillejos, J. Bartosova, L. Bartos, and L. Gallego. 2012. Benefits for dominant red deer hinds

- under a competitive feeding system: food access behavior, diet and nutrient selection. *PLoS One* 7:e32780 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032780>.
- Chelikani, P. K., J. D. Ambrose, and J. J. Kennelly. 2003. Effect of dietary energy and protein density on body composition, attainment of puberty, and ovarian follicular dynamics in dairy heifers. *Theriogenology* 60:707–725. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00088-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00088-8).
- Conaprole. 2008. Recria Intensiva de los Reemplazos. Ficha Técnica No. 8 1ra Ed. J. L. Repetto, C. Cajarville, A. Mendoza, and G. Oleggini, ed. <http://www.eleche.com.uy/files/ficha-8-recria-intensiva-990?es>.
- Das, R., L. Sailo, N. Verma, P. Bharti, J. Saikia, Imtiwati, and R. Kumar. 2016. Impact of heat stress on health and performance of dairy animals: A review. *Vet. World* 9:260–268. [10.14202/vetworld.2016.260-268](https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.260-268).
- Dash, S., A. K. Chakravarty, A. Singh, A. Upadhyay, M. Singh, and S. Yousuf. 2016. Effect of heat stress on reproductive performances of dairy cattle and buffaloes: A review. *Vet. World* 9:235–244. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.235-244>.
- Davis Rincker, L. E., M. J. VandeHaar, C. A. Wolf, J. S. Liesman, L. T. Chapin, and M. S. Weber Nielsen. 2011. Effect of intensified feeding of heifer calves on growth, pubertal age, calving age, milk yield, and economics. *J. Dairy Sci.* 94:3554–3567. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3923>.
- de Trinidad, S. 2014. Alimentación diferencial durante la etapa lactante en terneras Holstein: Efectos inmediatos y residuales sobre el crecimiento, desarrollo corporal y pubertad. MS Thesis, Programa de Posgrados de la Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay.
- DeVries, T. J., M. A. G. von Keyserlingk, and K. A. Beauchemin. 2005. Frequency of feed delivery affects the behavior of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88:3553–3562. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73040-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73040-X).
- DeVries, T. J. 2010. Review: Behaviour and its role in the nutritional management of the growing dairy heifer. *Can. J. Anim. Sci.* 90:295–302.
- Dobson, H., and R. F. Smith. 2000. What is stress, and how does it affect reproduction? *Anim. Reprod. Sci.* 60–61:743–752.
- Drews, C. 1993. The concept and definition of dominance in animal behaviour. *Behaviour* 125:283–313. <https://doi.org/10.1163/156853993X0090>.
- Funston, R. N., J. L. Martin, D. M. Larson, and A. J. Roberts. 2012. Physiology and Endocrinology symposium: Nutritional aspects of developing replacement heifers. *J. Anim. Sci.* 90:1166–1171. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4569>.
- González, L. A., A. Ferret, X. Manteca, J. L. Ruiz-de-la-Torre, S. Calsamiglia, M. Devant, and A. Bach. 2008. Performance, behavior, and welfare of Friesian heifers housed in pens with two, four, and eight individuals per concentrate feeding place. *J. Anim. Sci.* 86:1446–1458. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0675>.
- Greter, A. M., T. J. DeVries, and M. A. von Keyserlingk. 2008. Nutrient intake and feeding behavior of growing dairy heifers: Effects of dietary dilution. *J. Dairy Sci.* 91:2786–2795. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1052>.
- Greter, A. M., K. E. Leslie, G. J. Mason, B. W. McBride, and T. J. DeVries. 2010. Effect of feed delivery method on the behavior and growth of dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 93:1668–1676. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2844>.
- Haldar, A., and B. S. Prakash. 2007. Effect of exogenous growth-hormone-releasing factor on blood metabolites and minerals in late maturing buffalo heifers (*Bubalus bubalis*). *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 91:326–332.
- Heinrichs, A. J., and C. Jones. 2016. Monitoring dairy heifer growth. Penn State Collage of Agricultural Sciences. Accessed May 20, 2016. <http://extension.psu.edu/animals/dairy/nutrition/heifers>.
- Heinrichs, A. J., and L. A. Swartz. 1990. Management of dairy heifers. Pennsylvania State Univ. Ext. Circ. 385. Pennsylvania State University, University Park.
- Landaeta-Hernández, A. J., P. Meléndez, J. Bartolomé, D. O. Rae, and F. Archbald. 2013. Effect of biostimulation and social organization on the interval from calving to resumption of ovarian cyclicity in postpartum Angus cows. *Theriogenology* 79:1041–1044. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.01.020>.
- Longenbach, J. I., A. J. Heinrichs, and R. E. Graves. 1999. Feed bunk length requirements for Holstein dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 82:99–109.
- Mackey, D. R., J. M. Sreenan, J. F. Roche, and M. G. Diskin. 1999. Effect of acute nutritional restriction on incidence of anovulation and periovulatory estradiol and gonadotropin concentrations in beef heifers. *Biol. Reprod.* 61:1601–1607.
- Manteca, X. 2009. *Etología Veterinaria*. 1st ed. Multiméica Ediciones Veterinarias, Barcelona, Spain.
- McShane, T. M., K. K. Schillo, J. A. Boling, N. W. Bradley, and J. B. Hall. 1989. Effects of recombinant DNA-derived somatotropin and dietary energy intake on development of beef heifers: I. Growth and puberty. *J. Anim. Sci.* 67:2230–2236.
- NRC. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington DC.
- Nonaka, I., N. Takusari, K. Tajima, T. Suzuki, K. Higuchi, and M. Kurihara. 2008. Effects of high environmental temperatures on physiological and nutritional status of prepubertal Holstein heifers. *Livest. Sci.* 113:14–23. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2007.02.010>.
- Perry, G. A. 2012. Physiology and Endocrinology symposium: Harnessing basic knowledge of factors controlling puberty to improve synchronization of estrus and fertility in heifers. *J. Anim. Sci.* 90:1172–1182. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4572>.
- Phillips, C. J. C., and M. I. Rind. 2002. The effects of social dominance on the production and behavior of grazing dairy cows offered forage supplements. *J. Dairy Sci.* 85:51–59.
- Pirlo, G., F. Miglior, and M. Speroni. 2000. Effect of age at first calving on production traits and on difference between milk yield returns and rearing costs in Italian Holsteins. *J. Dairy Sci.* 83:603–608.
- Rodríguez-Sánchez, J. A., A. Sanz, C. Tamanini, and I. Casasús. 2015. Metabolic, endocrine, and reproductive responses of beef heifers submitted to different growth strategies during the lactation and rearing periods. *J. Anim. Sci.* 93:3871–3885. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-8994>.
- Sabia, E., F. Napolitano, G. De Rosa, G. M. Terzano, V. L. Barile, A. Braghieri, and C. Pacelli. 2014. Efficiency to reach age of puberty and behaviour of buffalo heifers (*Bubalus bubalis*) kept on pasture or in confinement. *Animal* 8:1907–1916. <https://doi.org/10.1017/S1751731114001876>.
- Scharf, B., J. A. Carroll, D. G. Riley, C. C. Chase, S. W. Coleman, D. H. Keisler, R. L. Weaver, and D. E. Spiers. 2010. Evaluation of physiological and blood serum differences in heat-tolerant (Romosinuano) and heat-susceptible (Angus) *Bos taurus* cattle during controlled heat challenge. *J. Anim. Sci.* 88:2321–2336. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2551>.
- Schillo, K. K., J. B. Halls, and S. M. Hileman. 1992. Effects of nutrition and season on the onset of puberty in the beef heifer. *J. Anim. Sci.* 70:3994–4005.
- Shaffer, L., J. D. Roussel, and K. L. Koonce. 1981. Effects of age, temperature-season, and breed on blood characteristics of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 64:62–70.
- Stewart, T. S., C. R. Long, and T. C. Cartwright. 1980. Characterization of cattle of a five-breed diallel. II. Puberty in bulls and heifers. *J. Anim. Sci.* 50:808–820.
- Sutherland, M. A., S. R. Niekamp, R. W. Johnson, W. G. Van Alstine, and J. L. Salak-Johnson. 2007. Heat and social rank impact behavior and physiology of PRRS-virus-infected pigs. *Physiol. Behav.* 90:73–81. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.08.029>.
- Talavera, F., C. S. Park, and G. L. Williams. 1985. Relationships among dietary lipid intake, serum cholesterol and ovarian function in Holstein heifers. *J. Anim. Sci.* 60:1045–1051.
- Tozer, P. R., and A. J. Heinrichs. 2001. What affects the costs of raising replacement dairy heifers: a multiple-component analysis. *J. Dairy Sci.* 84:1836–1844.
- Ungerfeld, R., and S. P. González-Pensado. 2008. Social rank affects reproductive development in male lambs. *Anim. Reprod. Sci.* 109:161–171. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.12.006>.

- Val-Laillet, D., A. M. de Passille, J. Rushen, and M. von Keyserlingk. 2008. The concept of social dominance and the social distribution of feeding-related displacements between cows. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 111:158–172. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2007.06.001>.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Symposium: Carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583–3597.
- Wiltout, D. W., and L. D. Satter. 1972. Contribution of propionate to glucose synthesis in the lactating and nonlactating cow. *J. Dairy Sci.* 55:307–317.
- Yart, L., V. Lollivier, P. G. Marnet, and F. Dessauge. 2014. Role of ovarian secretions in mammary gland development and function in ruminants. *Animal* 8:72–85. <https://doi.org/10.1017/S1751731113001638>.
- Yelich, J. V., R. P. Wettemann, H. G. Dolezal, K. S. Lusby, D. K. Bishop, and L. J. Spicer. 1995. Effects of growth rate on carcass composition and lipid partitioning at puberty and growth hormone, insulin-like growth factor I, insulin, and metabolites before puberty in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 73:2390–2405.
- Yelich, J. V., R. P. Wettemann, T. T. Marston, and L. J. Spicer. 1996. Luteinizing hormone, growth hormone, insulin-like growth factor-I, insulin and metabolites before puberty in heifers fed to gain at two rates. *Domest. Anim. Endocrinol.* 13:325–338.
- Zanton, G. I., and A. J. Heinrichs. 2005. Meta-analysis to assess effect of prepubertal average daily gain of Holstein heifers on first-lactation production. *J. Dairy Sci.* 88:3860–3867.

Social dominance affects intake rate and behavioral time budget in pre-pubertal dairy heifers allocated in continuous competitive situations

C. Fiol^{1†}, M. Aguerre², M. Carriquiry³ and R. Ungerfeld⁴

¹Departamento de Bovinos, Facultad de Veterinaria, Instituto de Producción Animal Veterinaria, Universidad de la República, Ruta 1 km 42.500, 80100 San José, Uruguay; ²Programa de Posgrado, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Lasplacas 1550, 11600 Montevideo, Uruguay; ³Departamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Av. E. Garzón 780, 12900 Montevideo, Uruguay; ⁴Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Lasplacas 1550, 11600 Montevideo, Uruguay

(Received 30 December 2017; Accepted 6 September 2018; First published online 23 October 2018)

In intensive feeding systems, competition may be high and social dominance may affect animal performance by changing dry matter intake (DMI) and behavioral time budgets. If competition level is maintained over time, the strategies developed by heifers of different social status are expected to differ. Thus, the aim of this study was to compare individual DMI, intake rate and eating, ruminating, lying and standing behaviors in dominant (DOM) and subordinate (SUB) pre-pubertal dairy heifers in a model study implying continuous competitive situations. A total of 16 Holstein and Jersey × Holstein pre-pubertal heifers (251 ± 10 days old, weighing 208 ± 14 kg; mean ± SEM) were allocated into eight homogeneous dyads. Each dyad was maintained during 120 days (day 0 = beginning of measurements) in pens, and received a total mixed ration from one feeder/dyad. The DOM and SUB heifers were determined (day 0, twice during the first month of the experiment and every month afterwards) by observation of the winner in agonistic interactions in each dyad after the feed was supplied. The general activity pattern (eating, ruminating, lying and standing) of each heifer was recorded by direct instantaneous scan-sampling, every 10 min for 12 h, in 7 days (days 1, 21, 35, 60, 75, 100 and 120). Individual DMI was estimated with the double marker technique, in three intervals (I = days 17–26; II = days 78–87 and III = days 112–120), while estimated intake rate (kg/min) was calculated for each interval as the DMI per total eating time. After the experiment was concluded, data of the first 5 and the last 6 h of the 12 h scan-sampling (related to the moment the feed was supplied) was grouped according to the moments of greater and lesser competition for feed on each day. During the first 5 h, where competition was expected to be highest, no differences in eating behavior were found between heifers of different social status, but DOM heifers spent more time ruminating and lying than SUB heifers, while SUB spent more time standing than DOM heifers. No differences were found on DMI between DOM and SUB, but SUB ate at a faster rate on interval II compared with DOM heifers. In conclusion, in this model study of heifer dyads, SUB heifers had greater intake rate with no differences in feed intake, spent less time ruminating and lying, and more time standing than DOM heifers during the first hours after feed delivery.

Keywords: aggressiveness, cattle, dominance, social hierarchy, social behavior

Implications

Intensive feeding systems are used for dairy heifer rearing, mainly because they allow a better control of animal growth and greater BW gains than pasture based diets. In this model study where a competitive situation was maintained over time, subordinate (SUB) heifers ate faster, spent less time ruminating and more time standing than dominant (DOM) ones during the first hours after feed delivery, with no differences in feed intake. Thus, it is expected that heifers will cope with competitive situations differently according to

their social position. Further studies are necessary to determine if differences are maintained in heifers reared under commercial conditions.

Introduction

In group-housed domestic ruminants, social hierarchies and competition for feed affect feeding behavior (Grant and Albright, 2001). Social dominance is the relation of dominance/subordination established between individuals maintained by agonistic interactions (Drews, 1993) that may affect productive performance and behavior of cattle. In

† E-mail: cfiolepera@gmail.com

intensive feeding systems, in which animals are fed a total mixed ration (TMR), competition may be high and social dominance may affect animal performance by changing dry matter intake (DMI), feeding behavior patterns or efficiency of feed utilization (De Vries, 2010).

In dairy heifers, when competition for feed is exacerbated, feeding behavior patterns are affected (De Vries and von Keyserlingk, 2009), and the strategies developed by heifers of different social status appear to differ. If competition level is high, when feedbunk space per animal is low, heifers have shorter eating time and reduced daily BW gains (Keys *et al.*, 1978), but most of the authors have not reported differences in total DMI between heifers (Longenbach *et al.*, 1999; De Vries and von Keyserlingk, 2009). In the few studies that determined dominance order when competition level increased, it was reported that DOM cows stay at the feedbunk for longer than SUB cows, increasing their total feeding time (Grant and Albright, 2001; Val-Laillet *et al.*, 2008). In contrast, low-ranked animals are more often interrupted while they are eating, have shorter periods of consumption, and thus, need to visit more times the feeder than high-ranked animals (cows: Olofsson, 1999; heifers: González *et al.*, 2008a and 2008b). When the level of competition is high, to maintain DMI, low-ranked cattle need a higher intake rate than high-ranked ones (Harb *et al.*, 1985; Proudfoot *et al.*, 2009), and thus, they need to develop alternative behavioral strategies. Moreover, in these situations, SUB heifers spent more time standing and lying during periods where DOM heifers were eating (Olofsson, 1999) and showed higher variability in BW gains (González *et al.*, 2008a; Fiol *et al.*, 2017) than DOM ones. It should be noted that most of the above-mentioned studies are all short-term studies or block designs, and DMI was measured as the group mean, and individual differences may be lost.

Social competition is an important stressor (Proudfoot and Habing, 2015); therefore, high levels of competition are associated with high levels of stress in heifers (González *et al.*, 2008b) and bulls (Gupta *et al.*, 2007). Moreover, individual social status appears to affect the individual's ability to cope with crowding, influencing the animals' stress response (Huzzey *et al.*, 2012; Proudfoot and Habing, 2015). If the competitive situation is maintained over time, stress may become chronic, modifying animal's behavior (Trevisi and Bertoni, 2008). Behavioral parameters, such as rumination, lying and standing, can be used to evaluate the response of the animal to a situation of chronic stress (Friend, 1991; Trevisi and Bertoni, 2008). In this sense, rumination (Grant and Albright, 2001) and lying (Fregonesi *et al.*, 2007) times are reduced in stressed animals or when cows are overstocked at the freestall. In contrast, in overstocked cows and stressed calves standing time may be increased (Fregonesi *et al.*, 2007; Wilcox *et al.*, 2013).

The objective of the present study was to compare individual DMI, intake rate and eating, ruminating, lying and standing behaviors in DOM and SUB pre-pubertal dairy heifers maintained under continuous competitive situations. Although in most commercial systems heifers are maintained

in larger groups, as a strategy to study the effects of dominance we chose to maintain them in dyads as a model. We hypothesized that SUB heifers maintained under continuous competitive situations have lower DMI, higher intake rate (trying to compensate the decreased on DMI), reduced eating, ruminating and lying time, and increased standing time, compared with DOM heifers.

Material and methods

Animals and housing

The study was performed in the Campo Experimental N°2 of the Facultad de Veterinaria, San José, Uruguay (S 34°40', W 56°32') from October 2013 to March 2014 (spring-summer). The animals and the general procedures were the same used in another study that assessed the effects of social dominance on animal performance and metabolic status (Fiol *et al.*, 2017).

In brief, 16 Holstein ($n = 12$) and Jersey \times Holstein ($n = 4$) pre-pubertal heifers (251 ± 10 days of age; 209 ± 14 kg BW; mean \pm SEM) were allocated into eight homogeneous dyads, according to breed, age and BW. The sample size calculated to obtain a power test >0.80 was 14 heifers (G*Power 3.1, University of Düsseldorf). Heifers were managed in a single group (mixed with other heifers of the same age) and fed a ration plus hay supplementation from weaning (60 days of age) to the beginning of the study. Each dyad was maintained during 120 days (day 0 = beginning of measurements) in shed pens (5×8 m) separated 1 m by electrical fences from the adjacent pen. Heifers were fed once daily (between 0730 and 0830 h) a TMR with a 60 : 40 forage:concentrate ratio (Table 1). During the adaptation period (20 days; total duration of the study = 140 days) the potential DMI of each dyad was determined. Thereafter, to maximize competition between heifers, the amount of TMR offered to each dyad was restricted 5% upon the potential DMI and supplied on the same feeder (60 cm) throughout all the experiment. We did not find refusals along the study as feeders were empty at the end of the day. During the first 60 days of the study mean temperatures were over 23°C (range 22°C–31°C) and the temperature humidity index was greater than 72 (range 72–86; INIA La Estanzuela, Colonia), which corresponded to mild to moderate levels of heat stress.

Within dyad, the DOM and SUB heifer was determined by real time observations of the winning agonistic interactions in each dyad during 15 min immediately after TMR supplied on day 0, twice during the first month of the experiment and then every month afterwards. On the first two determinations, the same four trained observers made the determinations in the eight pairs of heifers to maintain the same criteria and maximize the intra- and inter-observer reliability. Thereafter, one of the four observers made the determination in each pair of heifers. A heifer was considered the winner when displaced physically the other heifer. In most cases the same heifer won all the interactions, but if not, the animal that won more interactions during the 15 min was considered as the DOM, while the other was the SUB.

Table 1 Composition, chemical analysis and nutritive value of total mixed ration¹ fed to pre-pubertal dairy heifers (on dry matter (DM) basis) according to the three intervals of DM intake estimation over the 120 days of the experiment

	Intervals ²	
	I	II and III
Ingredient (%)		
Corn silage	58.8	–
Pasture silage	–	59.7
Ground corn grain	28	32
Soybean meal	12.6	7.6
Commercial premix ³	0.56	0.54
Chemical (%)		
DM	30.3 ± 1.3	60.2 ± 2.9
Ash	7.0 ± 0.2	12.2 ± 0.3
CP	15.8 ± 0.6	14.8 ± 1.7
ADF	27.4 ± 2.8	19.4 ± 0.5
NDF	50.7 ± 4.6	31.9 ± 1.0
Ether extract	2.6 ± 0.3	2.4 ± 0.3
ME (MJ/kg) ⁴	9.9	10.3
CP/ME (g/MJ)	15.9	14.4

ME, metabolizable energy.

¹Diet was formulated for 0.800 kg/day average daily gain National Research Council (NRC), 2001.

²Intervals I, II and III corresponds to days 17-26, 78-87 and 112-120 of the experiment. The total mixed ration composition was the same in intervals II and III.

³On 100 g contained 0.8 g Rumensin[®], 20 g calcium carbonate, 5 g mineral and vitamins premix, 7 g oxide Mg, 36 g sodium bicarbonate, 2 g Procreatin-7[®], 5 g salt, 3 g Safmannan[®], 21.2 g Semitin.

⁴ME, estimated according to NRC (2001).

Behavioral recordings

The general activity pattern of each heifer was recorded by direct real time observation using instantaneous scan-sampling in seven specific days (days 1, 21, 35, 60, 75, 100 and 120) along the experiment. It was expected to find differences on behavioral parameters along the seven sampling days, especially because heifers could have some degree of habituation to the competitive situation that may also differ between DOM and SUB heifers. For each day, scan recordings were performed by the same observer every 10 min for 12 h (total = 73 recordings/day), from 0730–0830 h (hour 0 = TMR supply) to 1930–2030 h adjusting the beginning and ending time according to sunrise and sunset along the experiment. In each scan, it was recorded if the animal was eating (standing with the head in the trough), ruminating (chewing regurgitated feed, outside the feeder), lying (lying down with chin on the floor or head up) or standing (maintained an upright position on extended legs, without walking). Every time the heifer was recorded ruminating, it was noted if she was doing it standing or lying; therefore this activity was not mutually excluding the others.

Dry matter intake and intake rate

Individual DMI was estimated with the double marker technique (Velásquez *et al.*, 2018). The marker technique to estimate

DMI uses an external marker to estimate fecal output and an internal marker (naturally occurring in feedstuffs) to estimate dry matter (DM) digestibility (Velásquez *et al.*, 2018). In this study, the estimation of fecal excretion and DM digestibility were done with chromium oxide (Cr₂O₃), as an external marker, and indigestible NDF (iNDF) as internal marker, respectively.

Each animal was orally given a daily 6.0 g bolus of Cr₂O₃ containing 4.1 g/day of chromium (68.4%, chromium III oxide; Sigma-Aldrich, Buenos Aires, Argentina) during 10 days, on three different intervals along the experiment (I = days 17-26; II = 78-87 and III = 112-120). Thereafter, animals were observed for a short period of time to ensure that there was no regurgitation. On the last 5 days of each interval, ~ 400 g of fecal samples were collected directly from the rectum two times/day (Kozloski *et al.*, 2006). Samples were collected at different times in different days to consider the daily fluctuation of chromium excretion in feces. All samples were maintained at –20°C until analysis for chromium and DM digestibility. For chromium analysis, samples were dried in an air-forced oven at 60°C until achieved constant weight, and then ground until filtering through a 1-mm screen. Fecal samples were composited by heifer and interval. Chromium concentration on feces was determined on the Laboratorio de Bromatología e Nutrición de Ruminantes of the Universidad Federal de Santa Maria (Brazil) according to Czarnocki *et al.* (1961). Fecal excretion was estimated as chromium intake/chromium concentration in feces.

For DM digestibility, samples of the TMR were also collected daily during the last 5 days of each interval of Cr₂O₃ administration, composited and stored at –20°C for chemical analysis. Samples of TMR and feces were dried in an air-forced oven at 60°C until achieving constant weight, and then grounded until passed through a 2-mm screen. The iNDF was estimated by *in situ* incubation. In brief, samples of feces (6 g, in duplicate) and TMR (6 g, in triplicate) were placed in nylon bags (5 × 10 cm, 25-µm-pore-size bags; Ankom Technology Corporation, Macedon, NY, USA) and incubated in two non-lactating Holstein cows fitted with ruminal cannulas and fed a standard diet (70% alfalfa hay and 30% commercial concentrate) during 12 days (Lee and Hristov, 2013). Thereafter, the bags were removed from the rumen, manually washed with tap water for 5 min, and frozen at –20°C. Once the incubation series finished, all the bags were thawed and manually washed again until the rinse water was clear, and then dried at 60°C until achieving constant weight. The iNDF was considered as the NDF content in the undigested residue after 12 days of *in situ* incubation. Determination of NDF in feces and in TMR was performed on the Laboratorio de Nutrición Animal of the Facultad de Veterinaria (Montevideo, Uruguay) according to Mertens (2002), using a fiber analyzer (Ankom 200/220). Dry matter digestibility was determined as (g iNDF/kg feces – g iNDF/kg TMR)/(g iNDF/kg feces).

Afterwards, considering the fecal excretion and the DM digestibility that were calculated for each heifer, the DMI

(g/day) in each interval was determined as fecal excretion/ (1 – DM digestibility) (Velásquez *et al.*, 2018). To calculate the corrected individual DMI, the known amount of TMR offered and consumed by each dyad was weighted by the percentage that represented each heifer individual DMI in the dyad intake (sum of both heifer individual intake) estimated by the double marker technique.

Intake rate (kg/min) was calculated as DMI/total eating time. Days of behavioral recordings that matched with each of the intervals of DMI estimation (day 1, 75 and 120 corresponds to intervals I, II and III of DMI estimation, respectively) were used to calculate the total eating time of each heifer. The eating time of each day of behavioral sampling was estimated assuming that the activity (eating) persisted over the entire 10-min period after the observation.

Chemical analysis of total mixed ration

Composited TMR samples were dried in a forced-air oven at 65°C for 48 h, ground in a hammer mill through a 1-mm screen, and stored at –20°C until chemical analysis. Samples were analyzed for DM by drying at 105°C until achieving constant weight in a forced-air oven according to Association of Official Analytical Chemists (AOAC 1997; method 7.003). Ashes were determined by combusting at 600°C for 2 h (AOAC, 1997; methods 7.009). Total N was assayed by Kjeldahl method (AOAC, 1997; method 984.13); ether extract was determined in a reflux system with ethyl ether for 3 h (Goldfish fat extractor; Labconco Corporation, Kansas City, MO, USA). Determination of NDF was done according to Mertens (2002), using heat-stable-amylase and expressed without ash content correction. Concentrations of ADF were determined according to method 973.18 of AOAC (1997).

Statistical analysis

For each of the 7 days of behavioral recording, frequency of each behavior was calculated as the number of times each heifer was observed doing each activity/the total number of scans per day (n = 73). Behavioral data of the first 5 h (30 first observations) and the last 6 h (last 36 observations) (related to the moment that the TMR was supplied) were

grouped for each day to account for the effects of the moments of greater and lesser competition for feed.

Residuals were tested for a normal distribution using the PROC UNIVARIATE statement (SAS® University Edition; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Behavioral data were not normally distributed, and were analyzed using the PROC GLIMMIX (SAS® University Edition) with the intercept random and the compound structure or the first-order autoregressive covariance structure, and binomial or Poisson distribution. The covariance structure used was decided according to the Bayesian information criteria, which allowed us to select the best fit covariance matrices for each behavior. For the first 5 h and the last 6 h, the model included the fixed effects of the social status (DOM or SUB), the day as the repeated measure, as well as the interaction between social status × day as main effects, and the dyad and animal (nested within the dyad) as random effects. The individual animal was considered the experimental unit. The heifer's birth date was included as covariate, and maintained in the model if *P* < 0.2.

Dry matter intake and intake rate were analyzed separately for each interval (interval I, II and III of DMI estimation) by PROC MIXED (SAS® University Edition) with the social status (DOM or SUB) as fixed effect and the dyad as random effect. Significant differences were considered when *P* ≤ 0.05 and tendencies as 0.05 < *P* ≤ 0.10. The results are presented as means ± SEM.

Results

There were no social status effects or interactions between social status and day on the number of times that the heifers were observed eating during the first 5 h (Table 2). Dominant heifers spent more time ruminating (*P* < 0.01) and lying (*P* = 0.04) during the first 5 h than SUB, and there was an interaction between social status and day for both activities (*P* = 0.01; Table 2). The times that the heifers were ruminating and lying were greater in DOM than in SUB heifers on days 1, 35, 100 and 120 and on days 100 and 120, respectively (Figure 1). The number of times that SUB heifers were

Table 2 Frequency of general activities (%) during the first 5 h after feed delivery in dominant (DOM; n = 8) and subordinate (SUB; n = 8) pre-pubertal dairy heifers maintained in dyads during 120 days¹

Activity (%)	DOM	SUB	SEM	P-value (F) ³		
				Social status	day	Social status × day
Eating	45.6	42.9	1.5	0.17 (1.9)	< 0.01 (5.8)	0.66 (0.7)
Ruminating ²	12.2	8.4	1.2	< 0.01 (17.5)	< 0.01 (11.4)	< 0.01 (3.1)
Standing	29.9	34.8	2.4	0.05 (3.7)	< 0.01 (49.0)	0.13 (1.7)
Lying	18.6	17.4	2.7	0.04 (4.4)	< 0.01 (28.9)	< 0.01 (5.5)

¹Heifers were allocated in dyads and received a total mixed ration daily. Behavior of each heifer was recorded on 7 days along the experiment by instantaneous scan sampling every 10-min for 12 h (total of 73 observations in each day). Hour 0 = total mixed ration supply. Values are presented as the mean for the first 5 h ((no. of counted postural or behavioral activities/30 observations) × 100) of scan sampling for each day.

²Every time the heifer was recorded ruminating, it was noted if she was doing it standing or lying, therefore this activity was not mutually exclusive with the others.

³Degrees of freedom for treatment and error were: 1 and 66 (social status) and 6 and 66 (day and social status × day).

standing during the first 5 h was greater than that of DOM heifers ($P=0.05$; Table 2). During the last 6 h no differences were found between social status on the number of times that heifers were observed eating (Table 3), but there was an interaction between social status and day ($P=0.001$): SUB spent more time eating than DOM heifers on days 21 and 100. Dominant heifers tended to spent more time standing ($P=0.08$) during the last 6 h than SUB heifers (Table 3). No differences were found in the frequencies of ruminating and lying during the last 6 h according to social status (Table 3).

No differences in DMI were found between DOM and SUB heifers along the three intervals of DMI determination (Table 4). Subordinate heifers ate at a faster rate ($P=0.02$)

compared with DOM during interval II (Table 4). No statistical differences were found for intake rate between heifers social status during interval I ($P=0.17$) or III ($P=0.20$) (Table 4).

Discussion

In this study, SUB heifers ate faster (greater intake rate), and displayed differences in feeding, lying and standing behaviors compared with DOM heifers when maintained under chronic competitive situations. We did not confirm one of our hypotheses, as no differences were found in DMI between DOM and SUB heifers, in agreement with other studies that evaluated feed intake in group of animals subjected to different levels of competition, either when feed was restricted (Keys *et al.*, 1978; Longenbach *et al.*, 1999) or offered *ad libitum* (González *et al.*, 2008b; De Vries and von Keyserlingk, 2009). In ruminants, intake rate is a good indicator of social constraints of feeding behavior, and can be modified under restricted feeding (Nielsen, 1999). Thus, in this study, the greater intake rate could prevented a reduction in DMI in SUB heifers, as reported by De Vries (2010) when competition at the feedbunk in heifers increased. Although we could not discriminate at which moment there was not more feed, studies have shown that cows consume 63% to 66% of their daily feed intake during the first 6 h after feed delivery (Nikkhah, 2011), which agrees with our observations of heifers' intake. In this sense, differences in eating time were found in the periods of lesser competition for feed (last 6 h after feed delivery), but it is possible that during those last hours of sampling there was no more feed available and that the heifers were not really eating but rather nosing the feedbunk. Considering this, it is interesting to speculate that SUB heifers ate at a faster rate especially during those first hours after feed delivery, when DOM heifers may have monopolized the feedbunk and had more feed available. Thus, under continuous competitive situations, DOM and SUB heifers altered their feeding behavior in different ways.

In addition, differences in intake rate allow us to speculate that DOM heifers were more efficient in selecting small

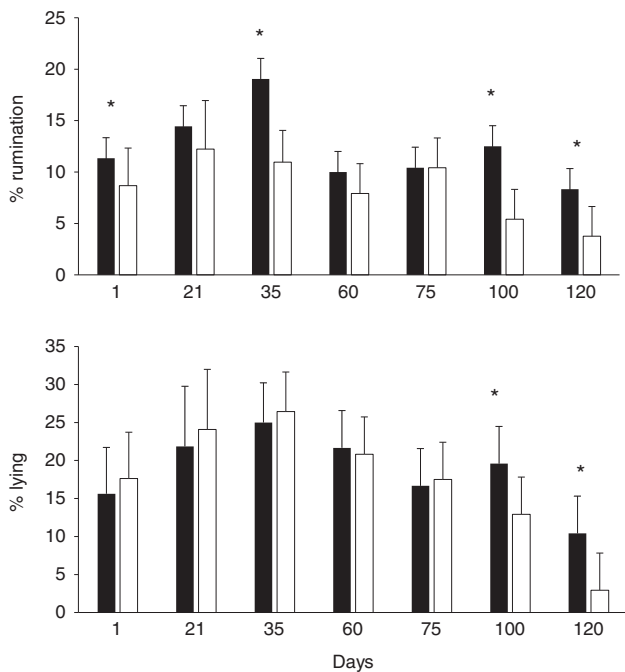


Figure 1 Frequency of ruminating and lying behaviors during the first 5 h of sampling (h0: feed delivery) during 7 days in dominant ($n=8$; black bars) and subordinate ($n=8$; white bars) pre-pubertal dairy heifers maintained in dyads during 120 days. A total of 7 days were defined, in which direct observation scan-sampling every 10 min during 12 h was done (total = 73 observations per day). * $P \leq 0.05$.

Table 3 Frequency of general activities (%) during the last 6 h after feed delivery in dominant (DOM; $n=8$) and subordinate (SUB; $n=8$) pre-pubertal dairy heifers maintained in dyads during 120 days¹

Activity (%)	DOM	SUB	SEM	P-value (F) ³		
				Social status	day	Social status \times day
Eating	8.5	10.1	2.7	0.55 (0.3)	< 0.01 (42.9)	< 0.01 (4.3)
Ruminating ²	31.9	30.3	1.9	0.13 (2.7)	< 0.01 (13.6)	0.57 (0.8)
Standing	47.3	44.8	2.3	0.08 (3.0)	< 0.01 (16.0)	0.17 (1.5)
Lying	42.7	44.2	4.2	0.65 (0.2)	< 0.01 (9.3)	0.30 (1.2)

¹Heifers were allocated in dyads and received a total mixed ration daily. Behavior of each heifer was recorded on seven Days along the experiment by instantaneous scan sampling every 10-min for 12 h (total of 73 observations in each Day). Hour 0 = total mixed ration supply. Values are presented as the mean for the last 6 h [(No. of counted postural or behavioral activities/36 observations) $\times 100$] of scan sampling for each Day.

²Every time the heifer was recorded ruminating, it was noted if she was doing it standing or lying, therefore this activity was not mutually exclusive with the others.

³Degrees of freedom for treatment and error were: 1 and 66 (social status) and 6 and 66 (day and social status \times day).

Table 4 Dry matter intake (DMI) and Intake rate in dominant (DOM; n = 8) and subordinate (SUB; n = 8) pre-pubertal dairy heifers maintained in dyads during 120 days. Heifers received a total mixed ration daily

	DOM	SUB	SEM	P-value (F) ⁴
DMI (kg/day) ^{1,3}				
Interval I	6.2	6.2	0.3	0.49 (0.01)
Interval II	6.6	7.0	0.3	0.16 (1.8)
Interval III	7.4	7.5	0.3	0.42 (0.06)
Intake rate (kg/min) ^{2,3}				
Interval I	0.029	0.033	0.002	0.17 (2.5)
Interval II	0.044	0.049	0.003	0.02 (8.2)
Interval III	0.052	0.067	0.005	0.20 (1.7)

¹Individual DMI of each heifer was estimated in three intervals using the double marker technique (Velásquez *et al.*, 2018).

²Intake rate was determined for each interval as: DMI/total eating time.

³Intervals I, II and III corresponds to days 17-26, 78-87 and 112-120 of the experiment.

⁴Degrees of freedom for treatment was 1 and for error: 10, 12 and 14 for DMI in intervals I, II and III, respectively, and 5, 6 and 14 for intake rate in intervals I, II and III, respectively.

particles like ground corn grain from the TMR than SUB heifers (Greter *et al.*, 2008). Supporting this interpretation, DOM heifers had greater plasma glucose concentrations than SUB heifers, which can be a consequence of consuming a more energetic diet (containing more corn grain) (Fiol *et al.*, 2017). Finally, a day effect was found on eating time: DOM and SUB heifers decreased their eating frequency during the last 6 h from days 1 to 35 compared with days 60 to 120. This could be related to the fact that heifers became habituated to the handling conditions: they received the feed only once per day, so they had to eat quickly.

Behavioral deviations are sensitive indicators of the animal's internal state (Friend, 1991). Dominant heifers ruminated more than SUB heifers during the first hours after feed delivery, which may be explained by: (1) most SUB heifers started their eating session later than DOM heifers (increased eating time during the last hours after feed delivery in SUB), thus ruminating activity began sooner in DOM than in SUB heifers and (2) DOM coped better with a competitive environment than SUB heifers. In addition, during those first hours after feed delivery more SUB than DOM heifers were standing, while more DOM than SUB heifers were lying. Thus, SUB heifers probably displayed more time the behaviors that may be linked to stress than DOM ones. In accordance with these results, social stress has been shown to be linked to a decrease in the time spent ruminating (Grant and Albright, 2001) and lying (Fregonesi *et al.*, 2007), and linked to increased standing time (Wilcox *et al.*, 2013). According to Gupta *et al.* (2008), animals in the standing posture may be less exposed to threats than when lying, or they may be exhibiting a greater active response. Thus, SUB heifers were probably more prepared for further changes – including threats – than DOM heifers. Moreover, social status appears to influence the individual's ability to cope with situations involving social stress (Huzzey *et al.*, 2012; Proudfoot and Habing, 2015). In this sense, although no differences were

found in DMI, DOM heifers increased faster their BW and were more precocious than SUB heifers, which may be also explained by a greater level of social stress in the latter or by different coping strategies according to their social status (Fiol *et al.*, 2017).

Environmental conditions, such as weather, management and housing facilities, influence ingestive behavior of ruminants (Alves *et al.*, 2017). The duration of time that SUB and DOM heifers remained standing during the first 5 h increased while the duration of rumination decreased from days 1-35 to days 60-120 (standing) and 75-120 (ruminating). In this sense, it has been reported that animals under heat stress increase time standing (Allen *et al.*, 2015), and decrease time lying (Zähner *et al.*, 2004) and ruminating in an attempt to improve heat dissipation (Abeni and Galli, 2017). Thus, it is possible to speculate that changes in behavior of the heifers along the study were at least partially explained by the prevailing management and weather conditions.

In this study, we tried to maximize feed competition by reducing feedbunk space and restricting the amount of feed provided to let the DOM heifers eat as much as they could and SUB heifers eat what was left. However, according to Longenbach *et al.* (1999) feedbunk space in this study was not so small. In addition, 5% restriction of potential DMI assigned to each pair of animals resulted in a low feed restriction because heifers of both social status maintained a very sustained and medium to high average daily gains (Fiol *et al.*, 2017). Previous studies reported no consistent relationship between social rank and stress response among different species (González *et al.*, 2008b; Miranda-de la Lama *et al.*, 2013). Intensity of the competition may influence those controversial results: in this study the low level of competition imposed could determine that SUB heifers were the most stressed animals, probably because they were trying to increase their social position, while DOM heifers were probably less stressed due to the low intensive competition (Abbott *et al.*, 2003; Miranda-de la Lama *et al.*, 2013). However, we cannot discard other interpretations as different strategies in DOM and SUB heifers to cope with social status.

In conclusion, SUB heifers increased their intake rate with no differences in DMI, spent less time ruminating and lying, and more time standing than DOM heifers during the first hours after feed delivery. Thus, it is expected that when heifers are maintained under a low but continuous competitive situation during the pre-pubertal period, feeding strategy and social behavior differ according to the social position of each heifer. Further studies are necessary to determine if differences are maintained in animals reared in larger groups under commercial conditions.

Acknowledgments

The authors are grateful to Ma. Noel Méndez, Augusto Lacava, Guillermo Matto, Francisco Triay, Annie dos Santos, Ana Maverino, Leticia Eustathiou, Verónica Sánchez, Ignacio Donadio, Stephani Bachini (veterinary students) and Federico de León,

Maximiliano Pastorini, Gustavo Cazard, Damián Sosa and Elena de Torres (Campo Experimental), for their help with animal handling and sampling procedures. The authors also thank Dr Gilberto Vilmar Kozloski (UFSC) for his help on data analysis and chromium determination. Financial support: Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC VUSP_45), Universidad de la República, Uruguay.

Declaration of interest

None.

Ethics committee

Animal care, handling and procedures were approved by the Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CEUAFVET-465, CHEA, Universidad de la República, Uruguay).

Software and data repository resources

None.

References

- Abbott DH, Keverne EB, Bercovitch FB, Shively CA, Mendoza SP, Snowdon CT, Ziegler TE, Saltzman W, Banjevic M, Garland T and Sapolsky RM 2003. Are subordinates always stressed? A comparative analysis of rank differences in cortisol levels among primates. *Hormones and Behavior* 43, 67–82.
- Abeni F and Galli A 2017. Monitoring cow activity and rumination time for an early detection of heat stress in dairy cow. *International Journal of Biometeorology* 61, 417–425.
- Allen JD, Hall LW, Collier RJ and Smith JF 2015. Effect of core body temperature, time of day, and climate conditions on behavioral patterns of lactating dairy cows experiencing mild to moderate heat stress. *Journal of Dairy Science* 98, 118–127.
- Alves JRA, Andrade TAA, Assis DM, Gurjão TA, Melo LRB and Souza BB 2017. Productive and reproductive performance, behavior and physiology of cattle under heat stress conditions. *Journal of Animal Behaviour and Biometeorology* 5, 91–96.
- Association of Official Analytical Chemists 1997. Official methods of analysis, 17th edition, 3rd revision. AOAC, Gaithersburg, MD, USA.
- Czarnocki J, Sibbald IR and Evans EV 1961. The determination of chromium oxide in samples of feed and excreta by acid digestion and spectrophotometry. *Canadian Journal of Animal Science* 4, 167–179.
- De Vries TJ 2010. Review: behaviour and its role in the nutritional management of the growing dairy heifer. *Canadian Journal of Animal Science* 90, 295–302.
- De Vries TJ and von Keyserlingk MAG 2009. Competition for feed affects the feeding behavior of growing dairy heifers. *Journal of Dairy Science* 92, 3922–3929.
- Drews C 1993. The concept and definition of dominance in animal behaviour. *Behaviour* 125, 283–313.
- Fiol C, Carriquiry M and Ungerfeld R 2017. Social dominance in prepubertal dairy heifers allocated in continuous competitive dyads: effects on body growth, metabolic status, and reproductive development. *Journal of Dairy Science* 100, 2351–2359.
- Fregonesi JAC, Tucker B and Weary DM 2007. Overstocking reduces lying time in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 90, 3349–3354.
- Friend TH 1991. Symposium: response of animals to stress. Behavioral aspects of stress. *Journal of Dairy Science* 74, 292–303.
- González LA, Ferret A, Manteca X, Ruiz-de-la-Torre JL, Calsamiglia S, Devant M and Bach A 2008a. Effect of the number of concentrate feeding places per pen on animal performance, behavior, and welfare indicators of Friesian calves during the first month after arrival at the feedlot. *Journal of Animal Science* 86, 419–431.
- González LA, Ferret A, Manteca X, Ruiz-de-la-Torre JL, Calsamiglia S, Devant M and Bach A 2008b. Performance, behavior, and welfare of Friesian heifers housed in pens with two, four, and eight individuals per concentrate feeding place. *Journal of Animal Science* 86, 1446–1458.
- Grant RJ and Albright JL 2001. Effect of animal grouping on feeding behavior and intake of dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 84, E156–E163.
- Greter AM, De Vries TJ and von Keyserlingk MA 2008. Nutrient intake and feeding behavior of growing dairy heifers: effects of dietary dilution. *Journal of Dairy Science* 91, 2786–2795.
- Gupta S, Earley B and Crowe MA 2007. Effect of 12-hour road transportation on physiological, immunological and haematological parameters in bulls housed at different space allowances. *Veterinary Journal* 173, 605–616.
- Gupta S, Earley B, Nolan M, Formentin E and Crowe MA 2008. Effect of repeated regrouping and relocation on behaviour of steers. *Applied Animal Behaviour Science* 110, 229–243.
- Harb MY, Reynolds VS and Campling RC 1985. Eating behaviour, social dominance and voluntary intake of silage in group-fed milking cattle. *Grass and Forage Science* 40, 113–118.
- Huzzey JM, Grant RJ and Overton TR 2012. Short communication: relationship between competitive success during displacements at an overstocked feed bunk and measures of physiology and behavior in Holstein dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 95, 4434–4441.
- Keys JE, Pearson RE and Thompson PD 1978. Effect of feedbunk stocking density on weight gains and feeding behavior of yearling Holstein heifers. *Journal of Dairy Science* 61, 448–454.
- Kozloski GV, Netto DP, de Oliveira L, Maixner AR, Leite DT, Maccari M, Brondani IL, Bonnacarrère Sanchez LM and Ferreira de Quadros FL 2006. Uso de óxido de cromo como indicador da excreção fecal de bovinos em pastejo: variação das estimativas em função do horário de amostragem. *Ciência Rural* 36, 599–603.
- Lee C and Hristov AN 2013. Short communication: evaluation of acid-insoluble ash and indigestible neutral detergent fiber as total-tract digestibility markers in dairy cows fed corn silage-based diets. *Journal of Dairy Science* 96, 5295–5299.
- Longenbach JJ, Heinrichs AJ and Graves RE 1999. Feed bunk length requirements for Holstein dairy heifers. *Journal of Dairy Science* 82, 99–109.
- Mertens DR 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. *Journal of AOAC International* 85, 1217–1240.
- Miranda-de la Lama GC, Pascual-Alonso M, Guerrero A, Alberti P, Alierta S, Sans P, Gajan JP, Villarroel M, Dalmau A, Velarde A, Campo MM, Galindo F, Santolaria MP, Sañudo C and María GA 2013. Influence of social dominance on production, welfare and the quality of meat from beef bulls. *Meat Science* 94, 432–437.
- National Research Council 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle, 7th revised edition. Academic Press, Washington DC, USA.
- Nielsen BL 1999. On the interpretation of feeding behaviour measures and the use of feeding rate as an indicator of social constraint. *Applied Animal Behaviour Science* 63, 79–91.
- Nikkhah A 2011. Eating timing an evolutionary manager of postmodern rumen physiology and health: a review. *Open Access Animal Physiology* 3, 13–19.
- Olofsson J 1999. Competition for total mixed diets fed for *ad libitum* intake using one or four cows per feeding station. *Journal of Dairy Science* 82, 69–79.
- Proudfoot K and Habing G 2015. Review. Social stress as a cause of diseases in farm animals: current knowledge and future directions. *Veterinary Journal* 206, 15–21.
- Proudfoot KL, Veira DM, Weary DM and von Keyserlingk MAG 2009. Competition at the feed bunk changes the feeding, standing, and social behavior of transition dairy cows. *Journal of Dairy Science* 92, 3116–3123.
- Trevisi E and Bertoni G 2008. Some physiological and biochemical methods for acute and chronic stress evaluation in dairy cows. *Italian Journal of Animal Science* 8, 265–286.
- Val-Laillet D, de Passille AM, Rushen J and von Keyserlingk M 2008. The concept of social dominance and the social distribution of feeding-related displacements between cows. *Applied Animal Behaviour Science* 111, 158–172.
- Velásquez AV, da Silva GG, Sousa DO, Oliveira CA, Martins CMMR, dos Santos PPM, Balieiro JCC, Rennó FP and Fukushima RS 2018. Evaluating internal and external markers versus fecal sampling procedure interactions when estimating intake in dairy cows consuming a corn silage-based diet. *Journal of Dairy Science* 101, 1–12.
- Wilcox CS, Schutz MM, Rostagno MR, Lay DC Jr and Eicher SD 2013. Repeated mixing and isolation: measuring chronic, intermittent stress in Holstein calves. *Journal of Dairy Science* 96, 7223–7233.
- Zähner M, Schrader L, Hauser R, Keck M, Langhans W and Wechsler B 2004. The influence of climatic conditions on physiological and behavioural parameters in dairy cows kept in open stables. *Animal Science* 78, 139–147.