



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**INCLUSIÓN DE FORRAJE FRESCO EN LA DIETA DE VACAS LECHERAS
ALIMENTADAS CON UNA RACIÓN TOTALMENTE MEZCLADA**

ALEJANDRO MENDOZA AGUIAR

TESIS DE DOCTORADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

**URUGUAY
2016**



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**INCLUSIÓN DE FORRAJE FRESCO EN LA DIETA DE VACAS LECHERAS
ALIMENTADAS CON UNA RACIÓN TOTALMENTE MEZCLADA**

ALEJANDRO MENDOZA AGUIAR

José Luis Repetto, Prof. PhD.
Director de Tesis

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

2016

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

Daniel Cavestany; DVTM, MS, PhD
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República – Uruguay

Fernando Bargo; Ing Agr, PhD
Escuela de Graduados “Alberto Soriano” SA
Universidad de Buenos Aires – Reino Unido

Henrique M. N. Ribeiro Filho; Zoot, MS, PhD
Departamento de Produção Animal e Alimentos
Universidade do Estado de Santa Catarina – Brasil



FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS
DE DOCTORADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

**“Inclusión de forraje fresco en la dieta de vacas lecheras
alimentadas con una Ración Totalmente Mezclada”**

Por: Mag. Alejandro MENDOZA AGUIAR

Director de Tesis: Dr. José Luis Repetto
Codirectora de Tesis: Dra. Cecilia Cajarville

Tribunal

Presidente: Dr. Daniel Cavestany

Segundo Miembro: Dr. Fernando Bargo

Tercer Miembro: Dr. Henrique Ribeiro Filho

Fallo del Tribunal:

Aprobada con revisión

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

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

Postgrados Académicos y Especializaciones

San José, 12 de diciembre de 2016

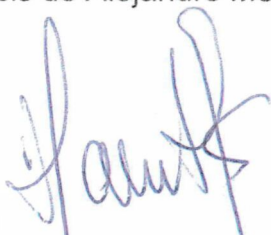
En el día de la fecha los integrantes del Tribunal de Tesis Doctoral del Ing. Agr. Mag. Alejandro Mendoza, Dres. Daniel Cavestany, Fernando Bargo, Henrique Ribeiro Filho hemos evaluado y aprobado la tesis con la siguiente calificación:

Aprobada con Mención, con la calificación S.S.S. (12).

La tesis de Alejandro Mendoza merece dicha calificación por su calidad científica, destacándose por su claridad en la escritura de la tesis, cumplimiento de los objetivos planteados y excelencia académica en la metodología utilizada. Esto se tradujo en una correcta presentación de resultados obtenidos y una discusión de los mismos en profundidad.

Se destaca también como un aspecto muy importante la aceptación para su publicación de 2 trabajos científicos inéditos en la reconocida revista internacional Journal of Dairy Science y un tercer trabajo científico inédito enviado a otra revista internacional que está en proceso de evaluación.

Por las razones argumentas, entonces, este jurado aprueba con mención y calificación 12 la tesis de Alejandro Mendoza.



Dr. Daniel Cavestany
Presidente del Tribunal

AGRADECIMIENTOS

A Alicia y Nicolás, las dos cosas que más amo en este mundo. Perdón por todo el tiempo que no estuve con ustedes. Ali, gracias por ser como sos, día a día me hacés sentir el hombre más feliz de la Tierra. Nico, vos fuiste el resultado más inesperado pero también el más hermoso de esta tesis.

A mis padres, gracias por todas sus enseñanzas y por su apoyo, si llegué hasta acá fue por ustedes. A Vero y a Sofi por todo su cariño y por estar siempre a mi lado aún a la distancia.

A Cecilia y Joselo, por su confianza y apoyo durante todas las etapas de este trabajo. Gracias por contagiarme esa pasión por tratar de elevar la calidad de la investigación que se hace en Uruguay, y por demostrar con hechos día a día que es posible lograrlo.

A la barra de los Departamentos de Bovinos y Nutrición Animal de Facultad de Veterinaria: Ale, Alsiane, Álvaro, Analía, Carolina, Coco, Germán, Gonzalo, Martín y Sofia, y a todos los estudiantes que han estado y que sin duda vendrán. Siempre metiendo para adelante, siempre juntos, y siempre con una sonrisa. Me siento honrado de formar parte de este equipo de trabajo.

A Nicolle y Maxi, compartimos tesis casi paralelas y vivimos juntos todos los vaivenes que conlleva la realización de estos trabajos. Gracias por sus consejos académicos y de los otros, y por su ayuda con los análisis de los resultados de la tesis.

A Elena de Torres, directora del campo experimental N°2 de Facultad de Veterinaria, por facilitar la realización de este trabajo, y al personal de apoyo de dicho campo, en especial a Adriana y Gustavo Cazard, y Federico De León.

Al Dr. Martín Fraga, del Instituto Clemente Estable, y el Dr. Darío Hirigoyen y la Ing- Quim. Marina Constantin del Laboratorio COLAVECO, por su generosa colaboración en la determinación del perfil de ácidos grasos de la leche.

A Rodolfo Ungerfeld, por sus consejos y sugerencias en distintas etapas de la elaboración de la tesis.

A todos los tesisistas de grado que colaboraron de una u otra forma en este trabajo: Victoria Amaral, Rossana Colla, Emanuel de la Quintana, Martín Duvós, María Eugenia Garmendia, Gonzalo Gaudentti, Agustín Iriarte, Enrique Iriarte, Ramiro López, Nicolás Machiavello, María Eugenia Martín, Emiliano Mutuberría, Eliana Piroto, María Puig, Federico Ressio, Feliciano Rosas y Fernando Zapater. Sin su apoyo este trabajo no hubiera sido posible.

Al Dr. Glen Broderick, por sus valiosos aportes durante el diseño de este trabajo y el análisis posterior de los resultados.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación, por apoyar económicamente la realización de este proyecto de tesis (Proyecto FMV_2009_1_2963).

Al Programa de Posgrado de Facultad de Veterinaria por darme a mí y a tantos otros la posibilidad de realizar posgrados académicos al más alto nivel en nuestro país y de forma gratuita.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.....	3
Consumo, digestión y metabolismo en la vaca lechera.....	3
Consumo.....	3
Digestión y metabolismo.....	4
Síntesis de la leche y sus componentes.....	7
Alimentación de vacas lecheras con pasturas y suplementos.....	10
Alimentación de vacas lecheras con raciones totalmente mezcladas.....	11
Alimentación de vacas lecheras con ración totalmente mezclada y pasturas.....	12
Efectos sobre el consumo, la producción y la composición de la leche.....	16
Efectos sobre la digestión y el metabolismo.....	17
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
HIPÓTESIS	21
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
Animales y tratamientos	24
Mediciones.....	26
Comportamiento	26
Consumo.....	26
Producción y composición de leche.....	27
Digestibilidad	28
Tasa de pasaje.....	29
Fermentación en rumen.....	30
Flujo de nitrógeno microbiano a duodeno y utilización del nitrógeno	30
Metabolitos y hormonas en sangre	31
Análisis estadístico.....	31
RESULTADOS	33
DISCUSIÓN.....	44
CONCLUSIONES GENERALES E IMPLICANCIAS.....	49
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
ANEXOS.....	I

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro I. Resumen de los experimentos usados para evaluar los efectos del uso de dietas que combinan ración totalmente mezclada (RTM) y forraje fresco sobre el consumo de energía neta para lactancia, la producción de leche corregida por grasa, y la eficiencia aparente de uso del alimento en vacas lecheras	14
Cuadro II. Ingredientes y composición de nutrientes (desvío estándar entre paréntesis) de la ración totalmente mezclada (RTM) y el forraje fresco (expresados como % de la materia seca (MS), salvo que se indique otra cosa).....	25
Cuadro III. Comportamientos (expresados como proporción del total de observaciones realizadas por animal), y tasa de consumo de materia seca (TCMS) durante las primeras 12 horas luego del inicio de la primera sesión de alimentación a las 0800 h	33
Cuadro IV. Consumo de material seca (MS), nutrientes y agua.....	35
Cuadro V. Producción y composición de leche	36
Cuadro VI. Perfil de ácidos grasos (AG) en leche.....	37
Cuadro VII. Digestibilidad de nutrientes, y tasa de pasaje.....	38
Cuadro VIII. Fermentación en rumen	39
Cuadro IX. Flujo de nitrógeno (N) microbiano a duodeno y utilización del N.....	41
Cuadro X. Metabolitos y hormonas en sangre	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Relación entre la proporción de la energía neta para lactancia (EN_L) total consumida proveniente de forraje fresco y: (A) la producción de leche corregida por grasa al 4% (LCG ; kg/d); (B) el consumo EN_L (Mcal/d); (C) la eficiencia aparente de uso de la EN_L ($LCG/Consumo$ de EN_L) de los tratamientos que combinan ración totalmente mezclada (RTM) y forraje fresco, expresada como proporción del tratamiento 100% RTM (testigo), reportada en 14 experimentos	15
Figura 2. Comportamiento de comer (A), rumiar (B) o realizar otras actividades (C), expresados como proporción del total de observaciones, y tasa de consumo de material seca (TCMS) (D). Los asteriscos en cada hora indican la existencia de al menos una diferencia entre tratamientos ($P \leq 0,05$). T0 = 24 h de acceso a ración totalmente mezclada; T4 = 4 h de acceso a forraje fresco y 20 h de acceso a ración totalmente mezclada; T8: 8 h de acceso a forraje fresco y 16 h de acceso a ración totalmente mezclada. El forraje fresco fue ofrecido a partir de las 0800 h (inicio de la primera sesión de alimentación).	34
Figura 3. pH (A) y concentraciones de N amoniacal ($N-NH_3$) (B) en rumen. Los asteriscos o cruces en cada hora indican la existencia de al menos una diferencia entre tratamientos ($P \leq 0,05$, o $0,05 < P \leq 0,10$, respectivamente). T0 = 24 h de acceso a ración totalmente mezclada; T4 = 4 h de acceso a forraje fresco y 20 h de acceso a ración totalmente mezclada; T8: 8 h de acceso a forraje fresco y 16 h de acceso a ración totalmente mezclada. El forraje fresco fue ofrecido a partir de las 0800 h (inicio de la primera sesión de alimentación).	40
Figura 4. Concentraciones sanguíneas de insulina (A), glucagón (B), glucosa (C) y urea (D). Los asteriscos o cruces en cada hora indican la existencia de al menos una diferencia entre tratamientos ($P \leq 0,05$, o $0,05 < P \leq 0,10$, respectivamente). T0 = 24 h de acceso a ración totalmente mezclada; T4 = 4 h de acceso a forraje fresco y 20 h de acceso a ración totalmente mezclada; T8: 8 h de acceso a forraje fresco y 16 h de acceso a ración totalmente mezclada. El forraje fresco fue ofrecido a partir de las 0800 h (inicio de la primera sesión de alimentación).	42

RESUMEN

El objetivo de este proyecto de doctorado fue estudiar la respuesta digestiva, metabólica y productiva de alimentar a vacas lecheras con dietas que combinan ración totalmente mezclada (**RTM**) y forraje fresco (**FF**) de alta calidad. Para ello se seleccionaron 9 vacas Holstein del rodeo del Campo Experimental de Facultad de Veterinaria (Universidad de la República) en Libertad, que fueron asignadas a los siguientes tratamientos de acuerdo a un diseño de cuadrado latino 3 x 3 replicado 3 veces, con períodos de 20 d de duración y medición en los últimos 10 d: 0 (T0), 4 (T4) y 8 (T8) h de acceso diario a FF. El FF (*Lolium multiflorum*) fue cortado diariamente y ofrecido *ad libitum* desde las 0800 h de comederos individuales, y una RTM fue ofrecida *ad libitum* durante el período en que las vacas no tuvieron acceso al FF. La proporción del tiempo dedicado a comer o rumiar no fue afectada por los tratamientos durante las primeras 12 h luego del inicio de la primera sesión de alimentación, pero las vacas T4 y T8 dedicaron una alta proporción del tiempo disponible a comer y lograron altas tasas de consumo de materia seca solo cuando tuvieron acceso a la RTM. El consumo total de energía neta para lactancia y proteína cruda fue mayor en T0 y T4 respecto a T8, lo que se vio reflejado en mayores concentraciones sanguíneas de glucosa e insulina en T0, pero no urea. En las vacas T8, el rendimiento de leche, proteína y caseína disminuyó en 1,7, 0,05 y 0,06 kg/d, respectivamente, y el rendimiento de grasa y lactosa tendió a disminuir en 0,11 y 0,08 kg/d, respecto a las vacas T0; sin embargo, los tratamientos no afectaron la composición de leche, o la eficiencia bruta de uso de la energía y el nitrógeno para producción de leche. El perfil de ácidos grasos en la leche de las vacas T8 tuvo una mayor concentración de ácido ruménico, vaccénico y linolénico respecto a T0. A nivel ruminal, la concentración total de ácidos grasos volátiles fue mayor en T0 y T4 respecto a T8, el pH fue menor en T4 respecto a T8, y el nitrógeno amoniacal fue mayor en T0 respecto a T8. No hubo diferencias entre tratamientos respecto al flujo de nitrógeno microbiano a duodeno o la digestibilidad de los nutrientes, pero el tiempo medio de retención total de la digesta en el tracto fue mayor en T8 respecto a T0. Se concluye que vacas con 4 h de acceso diario a un FF de alta calidad tuvieron un consumo de nutrientes y una producción de leche similar al de vacas alimentadas únicamente con RTM. Sin embargo, un acceso de 8 h al FF redujo tanto el consumo como la producción de leche y sólidos sin cambios en la digestión o la eficiencia bruta de uso de los nutrientes, aunque la leche producida tuvo un mayor contenido de ácidos grasos considerados beneficiosos para la salud humana.

SUMMARY

The aim of this project was to study the digestive, metabolic and productive response of dairy cows fed with diets that combine total mixed ration (TMR) and fresh forage (FF). 9 Holstein cows were selected from the herd of the Research Station of the Veterinary Faculty (University of the Republic), that were assigned to the following treatments according to a three 3 x 3 Latin squares design, with 20-d periods with sampling in the last 10 d: 0 (T0), 4 (T4) and 8 (T8) h of daily access to FF. Forage (*Lolium multiflorum*) was cut daily and offered *ad libitum* beginning at 0800 h in individual stalls, and a TMR was offered *ad libitum* during the period when cows had no access to FF. The proportion of time spent eating or ruminating was not affected by the treatments during the first 12 h after the beginning of the feeding bout, but T4 and T8 cows spent a high proportion of the available time eating and achieved a high dry matter intake rate only when they had access to TMR. Energy and protein intake were higher in T0 and T4 than T8, which reflected in higher blood glucose and insulin concentrations in T0, but not urea concentrations. Compared with T0, 8 h/d of access to FF decreased milk, protein, and casein yields by 1.7, 0.05 and 0.06 kg/d, respectively, and tended to decrease fat and lactose yields by 0.11 and 0.08 kg/d, respectively; however, treatment did not affect milk composition or gross feed efficiency. The milk fatty acid profile in T8 had a higher content of rumenic, vaccenic, and linolenic acids compared with T0. Ruminal total volatile fatty acid concentrations in the rumen were higher in T0 and T4 than in T8, pH was lower in T4 than in T8, and ammonia-N was higher in T0 than in T8. No differences among treatments were detected in microbial protein flow to the duodenum or digestibility of nutrients, but the total mean retention time of feed in the digestive tract was higher in T8 than in T0. It is concluded that cows with 4 h of access to high-quality FF had similar DMI levels and milk yields as cows fed only with TMR. However, 8 h of access to FF reduced DMI and milk and solids yield without changes in nutrient digestion or feed efficiency, although milk fat had enhanced levels of beneficial fatty acids.

INTRODUCCIÓN

La selección genética ha conducido a un incremento en el potencial de producción de las vacas lecheras a nivel mundial en las últimas décadas, y como resultado ha ocurrido un aumento marcado en los requerimientos de nutrientes de los animales, pero un aumento más moderado de la capacidad de consumo de los mismos. Esto ha llevado a que las vacas tengan más dificultades para satisfacer sus elevados requerimientos, lo que hace necesario aumentar la densidad de nutrientes de la dieta que se les ofrece (Eastridge, 2006). Con distintos grados de intensidad, esta situación de aumento del potencial productivo de los animales a través de la selección genética, básicamente a través de la introducción de genética Holstein proveniente de países con sistemas lecheros estabulados, también ha ocurrido en distintos países donde los sistemas lecheros de base pastoril son predominantes (Harris & Kolver, 2001; Elzo et al., 2004; Dillon et al., 2006).

En un contexto de creciente demanda mundial por granos para la alimentación humana y la fabricación de biocombustibles, las pasturas seguirán ocupando un lugar importante en la alimentación de los rumiantes, sobre todo en países que tienen ventajas climáticas y edáficas para producirlas y utilizarlas con el ganado durante todo el año. Esto es debido a que las pasturas compuestas por gramíneas y/o leguminosas templadas, tanto anuales como perennes, poseen un elevado valor nutritivo y ofrecen un amplio margen para la producción de rumiantes (Cajarville et al., 2012). Adicionalmente, la leche producida por vacas alimentadas con pasturas presenta altas concentraciones de compuestos nutraceuticos beneficiosos para la salud humana (Elgersma et al., 2006), y se considera que la alimentación en base a pasturas promovería un mayor bienestar de los mismos, respecto a sistemas de confinamiento (Rushen et al., 2008). Además, si se las utiliza adecuadamente, las pasturas cosechadas directamente por el animal tienen un costo relativo menor que los concentrados o las reservas forrajeras (Dillon, 2006).

Sin embargo, los sistemas de alimentación basados en pasturas tienen como limitante la dificultad de asegurar una oferta constante de alimentos en calidad y cantidad a lo largo del tiempo, y como resultado, existen más dificultades para cubrir los requerimientos de una vaca de alta producción, respecto a sistemas basados en el confinamiento; se ha planteado que la producción logable por vacas alimentadas solo con pasturas de alta calidad sería de alrededor de 30 kg/d (Kolver, 2003). Existen distintas razones que explican esta situación, como por ejemplo: a) la variación temporal en la cantidad y calidad del forrajes producido, b) limitaciones relacionadas con factores intrínsecos de la pastura, c) limitaciones relacionadas con las medidas de manejo adoptadas (e.g. tiempo en la franja de pastoreo), d) el costo energético asociado a la búsqueda y cosecha de forraje, entre otros (Chilibroste et al., 2005; Dillon, 2006).

Por lo tanto, en sistemas pastoriles donde se manejan vacas lecheras de alta producción, es imprescindible el uso de suplementos, como concentrados o reservas forrajeras (henos o ensilajes), como forma de cubrir los requerimientos de nutrientes de los animales que no son aportados por las pasturas. Tradicionalmente, los concentrados son ofrecidos dentro de la sala de ordeño, mientras que las reservas forrajeras se ofrecen fuera de la misma, en un patio o playa de alimentación, o bien

sobre una pastura. Sin embargo, trabajos realizados en el país demuestran que, incluso con estas estrategias de suplementación, los animales generalmente no cubren totalmente sus requerimientos, y por tanto no pueden explotar todo su potencial genético y ven resentido su desempeño tanto productivo como reproductivo (Meikle et al., 2004; Cavestany et al., 2005). Asimismo, y según la investigación nacional, incluso en los sistemas más intensivos ya se estarían explorando “techos” de producción a partir de la tecnología disponible, donde la oferta de pasturas que son suplementadas con concentrados y/o reservas forrajeras que se ofrecen en distinto momento del día ya no sería suficiente para seguir incrementando los niveles de producción (Durán, 2004). En particular, el incremento en la cantidad de suplemento ofrecido como forma de cubrir la demanda de vacas de alta producción puede causar problemas de salud a los animales, como la acidosis, que pueden comprometer la respuesta productiva de los mismos (Bramley et al., 2008), o reducir la eficiencia de utilización del alimento, con el consiguiente aumento de costos (Stockdale, 2010).

Por lo tanto, surge la necesidad de explorar nuevas alternativas de suplementación de vacas lecheras de alta producción manejadas en sistemas pastoriles, como una posible estrategia para continuar intensificando la producción. La utilización de dietas que combinan forraje fresco y una ración totalmente mezclada (definida ésta como el sistema de alimentación donde los forrajes conservados y concentrados son completamente mezclados, y de esta forma son ofrecidos a los animales; Gill, 1979) aparece como una estrategia promisorio, y será el objeto de estudio de esta tesis.

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Consumo, digestión y metabolismo en la vaca lechera

Consumo

El consumo de nutrientes es uno de los factores que limita en mayor medida el desempeño de los rumiantes (Roche et al., 2008). En este sentido, Crompton et al. (1960) y Dynes (1996) reportaron que en los rumiantes la variación en el consumo de nutrientes digestibles está explicada en un 60 a 90% por el consumo voluntario de alimento, y solo 10 a 40% por cambios en la digestibilidad del mismo. Por este motivo, el conocimiento de los factores que están involucrados en la regulación del consumo voluntario de las vacas lecheras es un área de continuo interés para la investigación, debido a las implicancias que tiene para la correcta formulación de las raciones de los animales.

Distintas teorías se han desarrollado para explicar cómo se regula el consumo voluntario en las vacas lecheras. Históricamente, estas teorías hacen referencia a una regulación de tipo física (en la que están implicados factores vinculados principalmente con el alimento) y otra fisiológica (donde los factores involucrados están asociados principalmente con el animal). De acuerdo a la teoría de la regulación física, el consumo voluntario del rumiante está limitado por la capacidad del tracto digestivo (en particular del rumen) para almacenar y permitir el pasaje de la digesta, y este efecto es tanto más marcado cuanto menor sea la calidad del alimento (Allen, 1996). En la medida que el rumiante consume alimento, las paredes del rumen se distienden de forma que una serie de receptores allí localizados son estimulados y envían señales al sistema nervioso, lo que lleva al cese del consumo. Por este motivo, la velocidad y extensión de la digestión del alimento consumido, en particular de su fracción fibrosa, definen la rapidez con que ocurre la evacuación de la digesta desde el rumen y permiten que el animal pueda volver a consumir alimento.

Otros autores han propuesto que el consumo estaría regulado por cambios que ocurren en la concentración o flujos de distintas sustancias como consecuencia de la ingesta de alimentos; dichos cambios estimularían distintos receptores que enviarían señales a los centros de saciedad a nivel del sistema nervioso y causarían el cese del consumo (Allen, 2000). Más específicamente, la regulación del consumo en el corto plazo se explicaría mayormente por la acción de sustancias sobre diversas vías sensoriales relacionadas con el hambre y la saciedad, mientras que la regulación en el largo plazo sería llevada a cabo por la acción de sustancias sobre el sistema neuro-humoral, que minimizaría las variaciones de corto plazo en el balance de nutrientes (e.g. energía) sobre las reservas metabólicas del animal (Roche et al., 2008). Dentro de las distintas sustancias (metabolitos y hormonas) que son secretadas por el animal y que pueden impactar a nivel del sistema nervioso, se conoce que algunas tienen un efecto estimulante sobre el consumo voluntario, mientras que otras tienen el efecto opuesto. Por ejemplo, dentro de las primeras se encuentra la hormona ghrelina o el neuropéptido Y, mientras que dentro de las segundas se encuentran distintos ácidos grasos volátiles (AGV) como el ácido acético y propiónico, sustancias nitrogenadas como el amoníaco, u hormonas como la colecistoquinina o la

leptina (Roche et al., 2008). Recientemente, Allen et al. (2009) postularon una teoría del control del consumo voluntario en vacas lecheras, elaborada sobre los conceptos de la regulación fisiológica, según la cual la sensación de hambre o saciedad en el animal sería consecuencia del estado energético del hígado, que vendría dado por el nivel relativo de oxidación de combustibles (i.e. ácido propiónico, ácidos grasos no esterificados) en dicho órgano.

Otros autores plantean que el consumo no está regulado por un único factor, sino que distintos factores no excluyentes probablemente estén regulando de forma simultánea el consumo de los animales. Por ejemplo, Forbes (2007) propuso una teoría multifactorial del control del consumo de rumiantes denominada del “mínimo discomfort total”, según la cual los animales consumen alimentos con el objetivo de minimizar las desviaciones entre los nutrientes que requieren y los que les son aportados por la dieta (tanto por exceso como por carencia).

Además de los factores físicos y metabólicos, la habilidad sensorial y los factores psicológicos del animal pueden contribuir en distinto grado a regular el consumo en los rumiantes. Por ejemplo, es conocido que los rumiantes son capaces de aprender a asociar las propiedades sensoriales de un alimento con las consecuencias metabólicas de consumir dicho alimento, tanto favorables (i.e. aporte de nutrientes deficitarios en la dieta) como desfavorables (i.e. presencia de toxinas), y que desde este punto de vista son capaces de seleccionar entre distintos alimentos, o dentro de un mismo alimento (Forbes, 2007).

En animales a pastoreo, todos los factores antes mencionados pueden estar operando en distintos momentos y en distinto grado, pero además se suman otros factores que no están presentes en animales alimentados en establos. Por ejemplo, se conoce que distintos atributos físicos y estructurales de las pasturas, como por ejemplo la altura y la densidad de la pastura, o la altura de inserción de las vainas, pueden afectar el consumo de forraje por parte de los animales, básicamente a través de sus efectos sobre el tiempo que el animal dedica a pastorear y/o la tasa de consumo, que a su vez resulta de la integración de la tasa de bocado y del peso del bocado (Chilibroste et al., 2005). Si bien las pasturas son alimentos que tienen generalmente un alto contenido de paredes celulares, y por lo tanto sería esperable que la regulación del consumo que opere en esta situación fuera principalmente de tipo física, ello no necesariamente ocurre en todos los casos. Cuando los animales se alimentan con pasturas templadas de alta calidad, otros factores como un alto contenido de humedad o elevadas concentraciones de productos de la fermentación ruminal podrían indicar el cese de la ingesta (Chilibroste et al., 2005).

Digestión y metabolismo

Los rumiantes poseen 3 pre-estómagos llamados retículo, rumen y omaso, que preceden al abomaso o estómago verdadero. El retículo y el rumen conforman un compartimento donde habita una gran población microbiana, compuesta por bacterias, protozoarios, hongos y arqueas. Los distintos integrantes de esta microbiota pueden ser clasificados según el sustrato que degradan preferentemente, y en este sentido pueden dividirse en microorganismos celulolíticos, amilolíticos o protelíticos, entre otros. También puede categorizarse en función del estrato que

ocupan dentro del rumen; así, hay microorganismos que están adheridos a las partículas de alimento (75% del total), o que están libres en la fase líquida, o bien adheridos a la pared ruminal (Van Soest, 1994).

Los microorganismos del rumen mantienen una estrecha relación simbiótica con el huésped. Por una parte, la permanencia de esta microbiota supone el mantenimiento de condiciones muy ajustadas de anaerobiosis, temperatura, acidez y humedad, así como la provisión continua de sustratos capaces de nutrir a los microorganismos, y de mecanismos de remoción de sustancias tóxicas o de desecho a través de su absorción a través de la pared del rumen o del pasaje de la digesta hacia el tracto posterior (Van Soest, 1994). Luego de su ingestión, los alimentos son masticados lo que permite hidratarlos y reducir su tamaño de partícula, que continúa siendo reducida a través de la rumia. De esta forma, se aumenta la superficie de exposición de las partículas de los alimentos para los microorganismos, facilitando su colonización por parte de éstos. Adicionalmente, la reducción del tamaño de partícula permite el pasaje del alimento hacia el omaso a través del orificio retículo-omasal y por lo tanto del tracto digestivo posterior, donde ocurrirá la digestión (Welch & Hooper, 1993).

Por otra parte, el rumiante obtiene la mayor parte de los nutrientes que precisa para cumplir con sus distintas funciones a partir de la actividad de la microbiota ruminal, que es capaz de convertir compuestos de baja calidad en nutrientes de alto valor biológico para el animal. Por ejemplo, gran parte de la dieta de los rumiantes está normalmente compuesta por forrajes, que tienen contenidos elevados de carbohidratos fibrosos, que son los que se encuentran en las paredes celulares. Este tipo de carbohidratos incluye a la celulosa y la hemicelulosa, que son polímeros complejos de glucosa unidos por enlaces β 1-4, para los que los rumiantes no tienen enzimas endógenas capaces de hidrolizarlos. Sin embargo, los microorganismos del rumen sí son capaces de fermentarlos. La fermentación de los carbohidratos resulta en la producción de AGV de cadena corta, que son un producto de desecho del metabolismo de los microorganismos, pero que una vez absorbidos a través de la pared del rumen pueden ser metabolizados en los distintos tejidos del animal, y constituirán entre 60 y 70% del aporte total de energía metabolizable para los rumiantes (Van Soest, 1994). Mientras que la fermentación de carbohidratos fibrosos como la celulosa y la hemicelulosa resulta en una producción proporcionalmente mayor de ácido acético y butírico, la fermentación de carbohidratos no fibrosos como el almidón resulta en una mayor producción de ácido propiónico. Para bovinos consumiendo distintas dietas, la concentración promedio de ácido acético, propiónico y butírico, expresada como porcentaje de la concentración total de AGV, es 63,1, 21,4 y 11,5%, respectivamente (Nozière et al., 2011).

Los rumiantes tienen requerimientos basales de glucosa similares a los de un monogástrico, pero debido a la fermentación ruminal de los carbohidratos, la cantidad de glucosa que es absorbida directamente a nivel intestinal es muy escasa. Por lo tanto, la demanda de glucosa del animal es principalmente cubierta a través de la gluconeogénesis hepática. El ácido propiónico es el más importante precursor de la glucosa, pudiendo contribuir con entre 60 y 74% del total necesario. Otros sustratos que también pueden ser usados como precursores para la síntesis de glucosa son aminoácidos (e.g. alanina y glutamina), glicerol y ácido láctico, cuyas contribuciones

relativas varían según la especie y/o estado fisiológico (Aschenbach et al., 2010). El mantenimiento de las concentraciones de glucosa en sangre depende de la acción de hormonas como la insulina y el glucagón, entre otras. La insulina estimula la entrada de glucosa al músculo esquelético y el tejido adiposo, aumenta la síntesis de glucógeno y reduce la tasa de gluconeogénesis a nivel hepático, mientras que en sentido opuesto, el glucagón estimula la conversión de ácido propiónico y de aminoácidos a glucosa en el hígado (Drackley et al., 2001). Sin embargo, la relación entre la acción de ambas hormonas es dependiente de la concentración de glucosa en sangre (Zarrin et al., 2015).

La digestión de los carbohidratos fibrosos es particularmente sensible a los cambios en el pH ruminal. Se acepta que cuando el pH cae por debajo de 6,2 la digestión de la fibra se reduce debido a una menor actividad de las bacterias celulolíticas (Hoover, 1986). Otros trabajos indican que la digestión de distintos forrajes se ve reducida cuando el pH cae por debajo de 6,0 o 6,1, aunque el valor crítico sería dependiente de la calidad del propio forraje (Mould et al., 1983). Estas observaciones generalmente han sido realizadas usando forrajes secos y de calidad media a baja; sin embargo, distintos trabajos *in vitro* e *in vivo* realizados con pasturas de alta calidad demostraron que la digestión de la fibra se reduciría a partir de pH menores que los tradicionalmente indicados, como por ejemplo 5,8 (de Veth & Kolver, 2001; Wales et al., 2004). Si bien la fermentación de carbohidratos no fibrosos es energéticamente más eficiente que la fermentación de los carbohidratos fibrosos, los primeros tienen una mayor tasa de producción de AGV. Por lo tanto, una dieta con una alta proporción de concentrados puede conducir a una disminución marcada del pH ruminal a consecuencia de la acumulación de AGV. Bajo estas condiciones, otros microorganismos ácido-tolerantes como *Streptococcus bovis* pueden prosperar, lo que conduce a un aumento en la producción de ácido láctico, que reduce aún más los niveles de pH y puede ocasionar cuadros de acidosis clínica (Calsamiglia et al., 2012).

De los carbohidratos que no fueron fermentados en rumen y que arriban al duodeno, el almidón es la única fracción que puede ser verdaderamente digerida en el intestino delgado del rumiante, bajo la acción de la amilasa pancreática y las disacaridasas intestinales. La proporción de almidón que no es degradada a nivel ruminal dependerá de la cantidad, de la forma física y de la estructura química del almidón ingerido, y también del nivel de consumo del animal, por sus efectos sobre el tiempo de retención de la digesta a nivel del rumen. Parte del almidón que llega sin degradar al duodeno también puede ser fermentado a nivel del intestino grueso del animal, pero los AGV producidos no pueden ser absorbidos a ese nivel y por lo tanto no son aprovechados por el animal (Reynolds, 2006). Si bien distintos autores han postulado que la digestión del almidón a nivel intestinal sería en teoría más eficiente energéticamente que su digestión a nivel ruminal (Bines & Hart, 1982), en la práctica los resultados han sido contradictorios (Nocek & Tamminga, 1991). Esto es posible debido a que las eventuales ventajas de la digestión intestinal de almidón (e.g. reducción de las pérdidas de metano a nivel de rumen; reducción de la dependencia del animal de la gluconeogénesis, que conlleva un costo energético) podrían verse anuladas si una porción importante de almidón fermenta en el intestino grueso, donde la eficiencia es muy baja debido a la pérdida de hexosas en la biomasa microbiana que se elimina en heces (Harmon & McLeod, 2001), o incluso si se generan procesos

de acidosis a nivel de este órgano, de forma similar a lo que puede ocurrir a nivel ruminal (Fahey & Berger, 1993).

Para la síntesis de sus propias proteínas, los microorganismos del rumen utilizan distintas fuentes de nitrógeno, como el nitrógeno amoniacal (**N-NH₃**). Este es un producto final del catabolismo de aminoácidos, péptidos y sustancias nitrogenadas no proteicas presentes en los alimentos ingeridos por acción de los microorganismos del rumen. Se ha planteado que una concentración de N-NH₃ en rumen de al menos 5 mg/dL permite maximizar la eficiencia de síntesis de proteína microbiana (Russell & Strobel, 1987). El exceso de N que no es utilizado por los microorganismos para sintetizar su proteína es absorbido hacia el medio interno través de la pared del rumen, donde es transportado hacia el hígado para ser convertido a urea. Desde allí, la urea puede eliminada por vía renal, o puede retornar al rumen a través de la saliva o por vía trans-mural, contribuyendo así al pool de N disponible para la síntesis de proteína microbiana (Lapierre & Lobley, 2001). Adicionalmente, los microorganismos requieren de esqueletos carbonados y energía, la cual es obtenida a través de los procesos de fermentación ya descritos.

La proteína que sale del rumen y llega al abomaso es solubilizada en el jugo gástrico (HCl y pepsina), y luego es digerida en el intestino delgado por acción de las enzimas producidas por el páncreas (e.g. tripsina y quimiotripsina) y por la mucosa intestinal (e.g. diversas peptidasas), y los aminoácidos resultantes son absorbidos por transportadores activos específicos (Sutton & Reynolds, 2011). En un rumiante, la proteína que llega al duodeno es la suma de la proteína microbiana, la proteína de origen alimenticio que no fue degradada en rumen, y la proteína de origen endógeno. La importancia de la proteína microbiana radica en que, al pasar junto al bolo alimenticio a los tramos posteriores del aparato digestivo, constituye el principal aporte de aminoácidos para el animal. La proteína microbiana no solo aporta típicamente más de la mitad de los aminoácidos requeridos por el rumiante, sino que además su valor biológico es elevado. La contribución relativa de la proteína microbiana para satisfacer las necesidades de aminoácidos del rumiante dependerá de la eficiencia con que la misma es sintetizada. Por ejemplo, Stern et al. (1994) calcularon que cuando la eficacia de síntesis es de 20 g de N/kg de materia orgánica verdaderamente fermentada en rumen, la proteína microbiana puede cubrir cerca del 50% de las necesidades proteicas de una vaca de 600 kg produciendo 25 litros de leche con 4% de grasa, pero si fuera 30 g N/kg cubriría el 73 % de las necesidades proteicas del mismo animal.

Síntesis de la leche y sus componentes

La leche es una secreción de los mamíferos producida para satisfacer las necesidades de nutrientes de los neonatos de cada especie, así como para cubrir otros requerimientos de inmunidad y defensa, así como otros requerimientos fisiológicos. En la vaca, la leche se puede definir como una dispersión coloidal de glóbulos de grasa, micelas de caseína y proteínas del suero en una solución acuosa de lactosa, minerales y una serie de componentes menores. La composición, y por lo tanto las propiedades tanto físicas como químicas de la leche, varía con distintos factores, especialmente la raza, etapa de lactancia, salud, estado nutricional, y aspectos individuales de cada animal (Fox, 2011).

La mayor parte de los lípidos de la leche se encuentran como triglicéridos, que son sintetizados en la glándula mamaria a partir de una molécula de glicerol y tres ácidos grasos (Jensen, 2002). Los ácidos grasos con un largo de cadena de entre 4 y 14 carbonos pueden ser captados directamente de la sangre, mientras que en el caso de los ácidos grasos con más de 16 carbonos son sintetizados en la propia glándula mamaria a partir de acetato y β -hidroxi-butirato de origen ruminal. Los ácidos grasos de 16 carbonos pueden tener un origen mixto (Bauman & Griinari, 2003). En términos generales, los ácidos grasos sintetizados *de novo* constituyen un 50% del total, mientras que los captados directamente de la sangre representan la otra mitad; con respecto a estos últimos, un 80% corresponden a ácidos grasos provenientes de la dieta, y el resto a ácidos grasos movilizados desde el tejido adiposo de la vaca. Sin embargo, durante momentos de balance de energía negativo en donde la movilización de reservas es más extensa, la contribución de estos ácidos grasos aumenta en relación directa al déficit energético, pudiendo representar hasta 40-50% del total secretado (Chilliard, 1999). Una vez que los triglicéridos se forman, se unen en gotas de lípidos que van creciendo en tamaño a medida que se unen con otras gotas, y se aproximan al lumen alveolar. Finalmente, las gotas de lípidos son rodeadas de una porción de la membrana celular y de esa forma se secretan al lumen alveolar (Mather, 2011).

En términos generales, las grasas lácteas de los rumiantes tienen una baja proporción de ácidos grasos poliinsaturados, debido a que estos ácidos grasos cuando son ingeridos son hidrogenados en una muy alta proporción a nivel ruminal. Las grasas lácteas de los rumiantes contienen niveles relativamente altos de ácidos grasos saturados, algunos de los cuales, como el láurico o el mirístico, tendrían efectos negativos sobre diversos aspectos de la salud humana (Kris-Etherton & Yu, 1997). Es de destacar, sin embargo, que dichas grasas pueden contener cantidades relevantes de ácido ruménico (*cis*-9, *trans*-11 ácido linoleico conjugado) o ácido vaccénico (*trans*-11 ácido vaccénico), que se producen como resultado de la hidrogenación incompleta del ácido linoleico en el rumen, y/o a partir de procesos de desaturación en la glándula mamaria (Harvatine et al., 2009). En particular, el ácido ruménico tendría efectos potencialmente benéficos en reducir la incidencia de cáncer, prevenir arterioesclerosis, hipertensión, y mejorar la función inmune (Bhattacharya et al. 2006).

Cuando las poblaciones microbianas del rumen se ven afectadas por algún motivo (e.g. un exceso de acidez, o un alto consumo de lípidos insaturados), el proceso de hidrogenación ruminal es alterado y como resultado, se acumulan ciertos ácidos grasos que normalmente no se forman en la secuencia normal de hidrogenación de los ácidos grasos insaturados. Si estos ácidos grasos pasan al duodeno y son absorbidos y luego captados por la glándula mamaria, pueden inhibir de forma marcada a gran parte de las enzimas responsables de formar los triglicéridos en la glándula mamaria a partir de ácidos grasos pre-formados o sintetizados *de novo*. Quizás el más conocido de estos ácidos grasos sea el *trans*-10, *cis*-12 CLA, pero existen otros como el *cis*-10, *trans*-12 CLA o el *trans*-9, *cis*-11 CLA. Incluso existen casos en los cuales ninguno de estos intermediarios serían los responsables de la depresión en la síntesis de grasa láctea, por ejemplo, cuando se ofrecen alimentos de origen marino (Bauman et al., 2008).

La proteína cruda de la leche se estima generalmente como su contenido de nitrógeno multiplicado por 6,38 (NRC, 2001). El contenido total de nitrógeno de la leche puede ser agrupado en tres fracciones: caseínas, proteínas del suero, y nitrógeno no proteico (NNP). En promedio, las caseínas comprenden un 78,5% del nitrógeno total, las proteínas del suero un 16,5%, y el NNP el restante 5%; a su vez, dentro del NNP el componente de mayor importancia es la urea (50%) (DePeters & Ferguson, 1992).

La mayor parte de las proteínas lácteas (alrededor de 90%) se sintetizan a partir de aminoácidos que circulan por la sangre y que son captados por la glándula mamaria; dentro de esta categoría se incluyen las caseínas y la mayor parte de las proteínas del suero. Estos aminoácidos provienen a su vez de distintas fuentes, siendo las más importantes la proteína digestible en intestino de origen microbiano, y la proteína del alimento que no se degrada en rumen pero se digiere en el intestino. Ambas fuentes constituyen lo que se denomina proteína metabolizable, es decir, la proteína verdadera que se digiere en intestino y cuyos aminoácidos son absorbidos a ese nivel (NRC, 2001). Además de estos sustratos nitrogenados, la síntesis de proteína láctea tiene una demanda específica de energía que es aportada por la glucosa. Adicionalmente, bajo ciertas condiciones la vaca tiene la capacidad de movilizar sus reservas lábiles de proteína, las cuales al no ser de gran magnitud (comparadas con las de grasa) se agotan rápidamente. Sin embargo, al comienzo de la lactancia pueden contribuir con hasta un tercio de los carbonos necesarios para la síntesis de caseínas (Chilliard, 1999). Con respecto a las proteínas que pasan directamente desde la sangre hacia la leche, se trata de una pequeña fracción que comprende algunas proteínas del suero como las inmunoglobulinas y albúminas. Una de ellas, la α -lactoalbúmina, forma parte del complejo enzimático responsable de sintetizar lactosa. Las proteínas lácteas que se sintetizan en el retículo endoplasmático rugoso son procesadas en el aparato de Golgi, se empaquetan en vesículas secretorias, y se secretan de la superficie apical hacia el lumen alveolar por exocitosis (Mather, 2011).

La lactosa, si bien normalmente no es un componente de la leche con valor comercial para la industria tiene una importancia fundamental, ya que al ser el principal osmoregulador de la captación de agua por la glándula mamaria determina el volumen de leche producido. Así, una mayor secreción de lactosa y su transporte hacia el sistema alveolar de la glándula mamaria conlleva un transporte de agua y por tanto una mayor producción de leche (Rigout et al., 2002). La lactosa está compuesta por una molécula de glucosa y galactosa, la que a su vez deriva de la glucosa, y es por ello que la captación de glucosa por la glándula mamaria es fundamental para su síntesis (Nielsen & Jakobsen, 1993). Del mismo modo que las proteínas sintetizadas *de novo*, las moléculas de lactosa se sintetizan en el aparato de Golgi y se empaquetan en vesículas secretorias que se aproximan hasta la membrana apical, desde donde se secretan al lumen alveolar por exocitosis (Mather, 2011). Se ha calculado que la glándula mamaria de una vaca lactando utiliza entre 65 y 80% del total de glucosa disponible, y que sólo la síntesis de lactosa consume entre 50 y 85% del total de glucosa captada por la glándula mamaria. Debido a su rol como regulador osmótico la lactosa es un componente cuya concentración en la leche es difícil de modificar a través del manejo.

Alimentación de vacas lecheras con pasturas y suplementos

La práctica de alimentar a vacas lecheras con pasturas está muy extendida en distintos países, como por ejemplo Nueva Zelandia, Australia, Argentina, Chile, Irlanda y Uruguay, entre otros. Generalmente, se trata de países que presentan ventajas comparativas (climáticas, edáficas, entre otras) en cuanto a posibilidades de producir y/o aprovechar pasturas de forma directa durante todo el año, o gran parte del mismo. En otros países o regiones, sin constituir el sistema de producción predominante, el interés por incluir pasturas en la dieta de vacas lecheras ha aumentado en los últimos años, por ejemplo en EEUU (Soder & Muller, 2007).

Una ventaja del uso de pasturas para alimentar a vacas lecheras radica en que generalmente presentan un menor costo relativo respecto a otros insumos como los forrajes conservados o los concentrados (Dillon, 2006). Además, la leche producida por vacas alimentadas con pasturas presentan características nutricionales deseables para la salud humana, particularmente en lo que refiere al perfil de ácidos grasos, donde destacan los altos contenidos de ácido ruménico, el cual presenta propiedades anti-cancerígenas (Kelley et al., 2007) y vaccénico (Elgersma et al., 2006). Esto se debe al alto contenido de ácido linolénico de las pasturas, que en rumen es hidrogenado parcialmente por los microorganismos a ácido vaccénico, el cual puede ser desaturado en la glándula mamaria a ácido ruménico (Palmquist et al., 2005). El alto contenido de estos ácidos grasos en la leche no afecta sus características organolépticas o reológicas, que incluso pueden verse mejoradas a medida que aumenta la proporción de pastura en la dieta (Croissant et al., 2007). Asimismo, cuando se los compara con sistemas de alimentación a base de ración totalmente mezclada, los sistemas de base pastoril ofrecen una imagen más “amigable” con el ambiente, en la medida en que minimizarían la polución y tendrían menos efectos negativos sobre la calidad del suelo (Hanson et al., 1998; Soder & Rotz, 2001). Finalmente, los sistemas pastoriles pueden tener beneficios sobre la salud de los animales, respecto a sistemas que usan raciones totalmente mezcladas, y desde este punto de vista se considera que promueven un mayor bienestar de los mismos (Rushen et al., 2008).

Sin embargo, está aceptado que, bajo condiciones de pastoreo, el consumo de nutrientes (particularmente energía) que las vacas pueden alcanzar es menor respecto a cuando son alimentadas con ración totalmente mezclada, y en consecuencia, el potencial de producción de leche no se aprovecha completamente (Kolver, 2003). Esta limitación del consumo potencial se debería a restricciones de tipo físicas (i.e. digestión y pasaje de material por el tracto digestivo), por limitación de tiempo (i.e. para actividades de búsqueda, cosecha y rumia del forraje ingerido), y por la alta cantidad de agua ingerida junto a la pastura (Dillon, 2006). Además, el consumo de nutrientes no puede ser predicho con tanta precisión como en sistemas que usan ración totalmente mezclada, porque las vacas se enfrentan a una situación donde el alimento ofrecido puede cambiar rápidamente tanto en cantidad como en composición, y porque pueden ejercer selectividad sobre la pastura ofrecida. Las vacas en pastoreo presentan costos de energía que no están presentes en situaciones de confinamiento y que están vinculados a las caminatas y a la búsqueda y cosecha del forraje (Kolver, 2003). Adicionalmente, la eficiencia de transferencia de nitrógeno a leche, que ya es baja en vacas alimentadas con ración totalmente

mezclada, es aún menor cuando son alimentadas con pasturas templadas de alta calidad, probablemente debido a la alta concentración de proteína soluble en las mismas, y a una posible falta de sincronización entre el aporte de nitrógeno y carbohidratos para los microorganismos del rumen (Hoekstra et al., 2007).

Por estos motivos, pero principalmente por las dificultades para alcanzar altos consumos de materia seca (**MS**), los animales manejados en sistemas pastoriles son generalmente suplementados con otros alimentos, como concentrados energéticos o proteicos, o reservas forrajeras como ensilajes, henolajes o henos, que son ofrecidos en cantidad variable dependiendo de la disponibilidad de pastura y de los objetivos productivos. Tradicionalmente, los concentrados son ofrecidos dentro de la sala de ordeño, mientras que las reservas forrajeras se ofrecen fuera de la misma, en un patio o playa de alimentación, o bien sobre una pastura. En términos generales, la suplementación de vacas lecheras de alto potencial genético manejadas con una oferta variable de pasturas tiene efectos positivos sobre el consumo total de los animales, así como sobre la productividad de los mismos, aunque la respuesta es muy variable, dependiendo de factores que involucran tanto al animal (e.g. potencial genético, etapa de lactancia), como a la pastura (e.g. disponibilidad de forraje, estructura vertical de la pastura), al tipo de suplemento (e.g. cantidad de suplemento ofrecido, forma de ofrecerlo), o al ambiente en dónde son alimentados (e.g. competencia en el comedero) (por una revisión, ver Bargo et al., 2003).

En particular, cuando la oferta de pastura es limitante, o los requerimientos de nutrientes son muy elevados, es preciso recurrir al uso de grandes cantidades de suplementos como forma de sostener altos niveles de producción de leche, particularmente concentrados. Bajo el manejo tradicional de suplementación de vacas a pastoreo, esto tiene una serie de implicancias productivas: a) el aumento en la cantidad de alimentos contrastantes que se ofrecen de forma separada puede conducir a situaciones de asincronía en la oferta de sustratos energéticos y nitrogenados a nivel de rumen, lo que podría reducir la eficiencia de la población microbiana (Cabrita et al., 2006), y b) una cantidad muy elevada de concentrados que se ofrecen en momentos puntuales (i.e. durante cada ordeño) puede conducir a la generación de un exceso de acidez a nivel ruminal, que puede desencadenar en procesos de acidosis sub-aguda o incluso en casos clínicos; esto podría verse exacerbado en caso que las pasturas tuvieran altos contenidos de azúcares solubles y/o bajos tenores de fibra efectiva (Bramley et al., 2008).

Alimentación de vacas lecheras con raciones totalmente mezcladas

Las raciones totalmente mezcladas (**RTM**) son un sistema de alimentación donde los forrajes y alimentos concentrados son completamente mezclados, y de esta forma son ofrecidos a los animales. El uso de RTM para la alimentación de vacas lecheras fue recomendado en países del Hemisferio Norte (principalmente EEUU y Europa) a partir de la década de 1960, ya que la mezcla de distintos ingredientes en una única ración tiene como ventaja la posibilidad de ofrecer una dieta con un aporte balanceado de nutrientes y una óptima relación forraje – concentrado, y con mínima posibilidad de selección por componentes individuales de la ración (Gill, 1979; Coppock et al., 1981). Esto determina que la formulación de la dieta sea más precisa cuando se ofrece una RTM que cuando se ofrecen sus ingredientes por separado.

Sin embargo, el uso de RTM tiene varias desventajas; por ejemplo, requiere el uso de equipos especiales para la mezcla adecuada y el reparto de la ración, así como instalaciones para la alimentación de los animales, para el tratamiento de los efluentes generados, y para el almacenamiento de los ingredientes a usar, todo lo cual supone una inversión en capital. Asimismo, en este sistema de alimentación es altamente recomendable la diferenciación de las vacas en lotes para un uso más eficiente de la RTM. Estos aspectos pueden llevar a que el uso exclusivo de dietas de tipo RTM sea anti-económico o al menos poco práctico de implementar en tambos con un número reducido de animales (Gill, 1979; Coppock et al., 1981).

Algunos de los aspectos citados han contribuido a dar al manejo en confinamiento una imagen más reñida con las buenas prácticas ambientales respecto a la alimentación a pastoreo (Soder & Rotz, 2001). Sin embargo, un análisis comparativo del impacto ambiental de los actuales sistemas intensivos de producción de leche de EEUU (basados en el uso de RTM) y los sistemas más tradicionales (basados en un mayor uso de pastura) reveló que los primeros requieren una menor cantidad de animales (-79%), alimentos (-77%), agua (-65%) y tierra (-90%) que los segundos para producir un billón de kg de leche, y por lo tanto producirían una menor cantidad de efluentes (-76%), metano (-57%) y óxido nitroso (-44%) por cada billón de litros (Capper et al, 2009). Ello sugiere que los sistemas basados en el uso de RTM no necesariamente son menos “amigables” *per se* con el ambiente que aquellos que usan una mayor proporción de pastura en la dieta.

Alimentación de vacas lecheras con ración totalmente mezclada y pasturas

En los últimos años ha habido un creciente interés por estudiar los efectos de combinar RTM y pastura para alimentar vacas lecheras. En países donde la alimentación del ganado lechero está basada principalmente en el uso de RTM, la inclusión de pasturas permitiría reducir los altos costos asociados a la alimentación y manejo de los animales. Por ejemplo, se ha reportado que su inclusión en la dieta de vacas lecheras alimentadas con una RTM puede resultar en un ingreso económico neto similar, aunque con menores costos totales, y con un menor riesgo económico inter-anual (Soder & Rotz, 2001). En países donde los sistemas lecheros son predominantemente pastoriles, la inclusión de una RTM permitiría incrementar los niveles de producción respecto al manejo más tradicional de incluir suplementos que se ofrecen de forma separada. En este sentido, Wales et al. (2013) demostraron que, en vacas alimentadas con una asignación restringida de pasturas, la respuesta en términos producción de leche corregida por energía al aumentar la cantidad consumida de suplementos (concentrados y reservas forrajeras) fue mayor cuando éstos se ofrecieron como una RTM en lugar de hacerlo de forma separada (concentrado dentro de la sala de ordeño y reservas forrajeras afuera). Este resultado fue explicado principalmente por un mayor porcentaje de grasa en el tratamiento con RTM, asociado a un pH ruminal promedio mayor y más estable, lo que de acuerdo a las teorías más recientes minimizaría la producción ruminal de ciertos ácidos grasos trans, como el *trans*-10, *cis*-12 CLA, que son potentes inhibidores de la síntesis de grasa a nivel de la glándula mamaria (Bauman et al., 2008).

Si bien se reconoce que el consumo y la producción de vacas lecheras es menor cuando se alimentan con pasturas respecto a RTM, existen diferencias importantes entre los estudios publicados. Por lo tanto, se realizó una búsqueda bibliográfica para identificar los experimentos publicados y que contaran con las siguientes características: a) debían contar con un tratamiento que ofreciera únicamente RTM, como testigo, b) debían contar con al menos un tratamiento que hubiera ofrecido forraje fresco (**FF**), fuera directamente cosechado por los animales, o bien cortado y ofrecido en fresco a los mismos, c) debían reportar la producción de leche corregida por grasa al 4%, o en su defecto debían reportar la información que permitiera estimarla, d) debían reportar el consumo de energía neta para lactancia (**EN_L**) total y de cada alimento por separado (RTM y FF), o en su defecto debían reportar la información que permitiera estimarlo, y e) debían reportar la eficiencia aparente de uso del alimento (kg leche corregida por grasa al 4%/consumo de **EN_L**), o en su defecto debían reportar la información que permitiera estimarla. Como resultado de la búsqueda, se consiguió obtener información de 14 experimentos (Cuadro I).

Cuadro I. Resumen de los experimentos usados para evaluar los efectos del uso de dietas que combinan ración totalmente mezclada (RTM) y forraje fresco sobre el consumo de energía neta para lactancia, la producción de leche corregida por grasa, y la eficiencia aparente de uso del alimento en vacas lecheras

Autor	Nº de vacas por tratamiento	Días en lactancia, y producción de leche (kg/d) inicial ¹	Especies predominantes en la pastura utilizada	Duración del experimento (d) ²	Tratamientos evaluados	Diseño experimental
Acosta et al. (2010)	8	22 - 20,6	<i>Medicago sativa</i> , <i>Festuca arundinacea</i>	75	RTM + pastura	DBCA
Bargo et al. (2002a)	15	109 - 44,9	<i>Bromus inermis</i> , <i>Dactylis glomerata</i>	147	RTM + pastura	DCA
Dall-Orsolletta et al. (2016)	4	132 - 19,4	<i>Lolium multiflorum</i>	21	RTM + 6 h de acceso a pastura	DCL
Fajardo et al. (2015)	12-15	1 - N/C	<i>Festuca arundinacea</i> , <i>Trifolium repens</i> , <i>Lotus corniculatus</i>	70	RTM + 6 o 9 h de acceso a pastura	DBIA
Kolver & Muller (1998)	8	59 - 46,3	<i>Lolium perenne</i> , <i>Trifolium repens</i> , y otras gramíneas templadas perennes	28	100% pastura	DBCA
Morales et al. (2010)	5	94 - 34,8	<i>Agrostis tenuis</i> , <i>Dactylis glomerata</i> , <i>Lolium perenne</i> , <i>Trifolium repens</i>	21	RTM + 6 o 12 h de acceso a pastura	DC
O'Neill et al. (2011)	24	64 - N/R	<i>Lolium perenne</i>	70	100% pastura	DBCA
Pomiés (2014)	4	90 - N/R	<i>Lolium multiflorum</i>	22	25 o 50% de forraje fresco en la dieta (base seca)	DCL
Salado et al. (2012a)	10	66 - 32,5	<i>Avena sativa</i>	42	25, 50 o 75% de pastura en la dieta (base seca)	DCA
Salado et al. (2014)	25	53 - 34,3	<i>Avena sativa</i> , <i>Medicago sativa</i>	168	25% de pastura en la dieta (base seca)	DCA
Schroeder et al. (2005)	6	117 - N/R	<i>Avena sativa</i>	30	100% pastura	DC
Soriano et al. (2001)	18	185 - 28,1	<i>Dactylis glomerata</i> , <i>Poa pratensis</i> , <i>Trifolium repens</i>	42	RTM + pastura ofrecida AM o PM	DBCA
Vibart et al. (2008), experimentos I y II	6 - 8	87 y 126 - 32,4 y 36,6	<i>Lolium multiflorum</i>	56	15, 30 o 45% de pastura en la dieta (base seca)	DBCA

¹ N/C = No corresponde; N/R = No reportado

² En el caso de experimentos con diseños no continuos el dato corresponde a la duración de cada período.

³ En todos los experimentos existió un tratamiento testigo correspondiente a 100% RTM que no se indica en el cuadro.

⁴ DCA = Diseño completamente al azar; DBCA = Diseño de bloques completos al azar; DBIA = Diseño de bloques incompletos al azar; DC = Diseño cruzado; DCL = Diseño de Cuadrado Latino

Tomando como base al tratamiento consistente en ofrecer 100% RTM de cada experimento, se estimó la relación entre la proporción de la EN_L total consumida que provenía del FF y las siguientes variables: a) consumo de EN_L , b) producción de leche corregida por grasa al 4% (**LCG**), y c) eficiencia aparente de uso de la EN_L ($LCG/\text{consumo de } EN_L$) de los tratamientos con inclusión de FF, expresada como proporción del tratamiento 100% RTM. Los resultados se reportan en la figura 1.

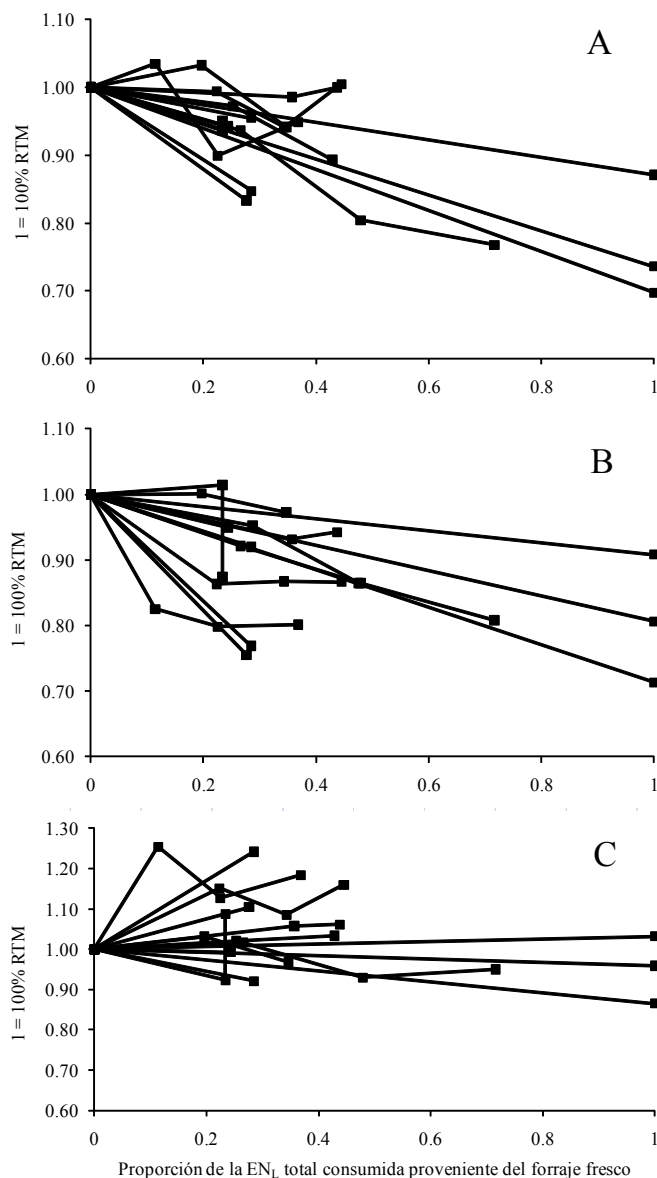


Figura 1. Relación entre la proporción de la energía neta para lactancia (EN_L) total consumida proveniente de forraje fresco y: (A) la producción de leche corregida por grasa al 4% (**LCG**; kg/d); (B) el consumo EN_L (Mcal/d); (C) la eficiencia aparente de uso de la EN_L ($LCG/\text{Consumo de } EN_L$) de los tratamientos que combinan ración totalmente mezclada (**RTM**) y forraje fresco, expresada como proporción del tratamiento 100% RTM (testigo), reportada en 14 experimentos

Efectos sobre el consumo, la producción y la composición de la leche

Como se observa en la figura 1, la tendencia general es que a mayor proporción de EN_L proveniente de FF en la dieta, tanto el consumo de EN_L como la producción de LCG tienden a disminuir. Es de destacar que en todos los experimentos la calidad del FF usado, medida a través del contenido de proteína cruda, FDA y/o digestibilidad de la MS o materia orgánica, puede ser considerada como media a alta o muy alta de acuerdo a la definición de Bargo et al. (2003). Hasta un valor aproximado de inclusión de entre 30 y 40% de EN_L proveniente de pastura no habría diferencias marcadas respecto a la producción alcanzable a partir de dietas 100% RTM. Sin embargo, se observa una importante variabilidad en las respuestas entre tratamientos, lo que a su vez se refleja en la débil relación entre la eficiencia aparente de utilización de la EN_L y la proporción de EN_L proveniente de pastura en la dieta. Por ejemplo, en un experimento realizado por Vibart et al. (2008) se reportó que el aumento en la proporción de EN_L proveniente de raigrás anual en estado vegetativo en una dieta RTM hasta 45% del consumo total de EN_L no afectó la producción de vacas lecheras. Del mismo modo, Morales et al. (2010) no reportaron diferencias en la producción de leche de vacas alimentadas únicamente con una RTM, o con combinaciones de RTM y pastura, aún con niveles de inclusión de EN_L proveniente de pastura de hasta 35% del consumo total de EN_L . Esta información coincide con una encuesta realizada a productores comerciales en EEUU, donde se concluyó que si bien puede haber una reducción en la producción de leche al pasar de un sistema tipo RTM a uno pastoril, esta reducción sería pequeña, en el orden de entre 3 y 5% (Hanson et al., 1998).

Sin embargo, Vibart et al. (2008), usando la misma pastura que en el trabajo ya señalado, pero en un estado más avanzado de madurez, reportaron que el aumento de la proporción de EN_L proveniente de la pastura de 11 a 37% redujo tanto el consumo total como la producción de leche. En el mismo sentido, Bargo et al. (2002a) reportaron que una inclusión de EN_L de pastura de 29% redujo el consumo total de EN_L en un 8%, y la producción de leche corregida por grasa al 4% en un 15%, respecto a una dieta 100% RTM. Otros autores han reportado disminuciones más moderadas en la producción de leche de vacas alimentadas con RTM y pastura respecto a solo RTM, del orden de 9%, si bien el porcentaje de la EN_L total consumida que provino de la pastura fue de 34% (Fajardo et al., 2015). Por lo tanto, es claro que distintos factores pueden estar involucrados en explicar estas diferencias entre experimentos, vinculados tanto al animal (e.g. potencial genético), como a la pastura y la RTM (e.g. calidad de alimento y oferta de alimento por animal), o al manejo de la alimentación (e.g. la secuencia de oferta de los alimentos), entre otros.

Es resaltable que en los experimentos donde la producción de leche no fue diferente entre tratamientos 100% RTM y los que incluían pastura en distinto grado, el consumo de MS tampoco fue distinto entre tratamientos (e.g. Vibart et al., 2008; Dall-Orsoletta et al., 2016). Y viceversa, en aquellos casos donde la inclusión de pasturas condujo a una depresión del consumo total, esto determinó una reducción en la producción de los animales (e.g. Bargo et al., 2002a). Esto concuerda con lo reportado por Kolver & Muller (1998), quienes estimaron que un 61% de la diferencia entre sistemas se debe a un menor consumo de MS en vacas alimentadas con pasturas respecto a RTM.

Con respecto a los efectos de incluir FF en la dieta de vacas alimentadas con una RTM sobre el perfil de ácidos grasos de la leche, los trabajos disponibles coinciden en señalar que, a mayor proporción de FF en la dieta, aumenta el contenido de ácidos grasos considerados beneficiosos para la salud humana. Por ejemplo, Looor et al. (2003) observaron una mayor concentración de ácido ruménico, vaccénico y linolénico en la grasa láctea de vacas alimentadas con pastura y RTM respecto a solo RTM. Del mismo modo, Bargo et al. (2006) reportaron que la concentración de ácido ruménico y vaccénico en la grasa láctea fue mayor, y la concentración de ácido mirístico y láurico menor, en vacas alimentadas con una dieta a base de RTM y pastura respecto a una dieta 100% RTM. Vibart et al. (2008) y Salado et al. (2012b) reportaron aumentos lineales en la concentración de ácido ruménico y linolénico en leche a medida que aumentó la proporción de FF en la dieta de vacas alimentadas con una RTM, mientras que los primeros además detectaron disminuciones lineales en la concentración total de ácidos grasos saturados a mayor nivel de inclusión de FF. Utilizando vacas alimentadas con una RTM, Morales et al. (2010) observaron una mayor concentración de ácidos grasos insaturados en la grasa láctea, en particular de ácido ruménico, vaccénico y linolénico, a medida que aumentaron las horas de acceso a una pastura de alta calidad. A nivel nacional, Barca (2016) reportó una mayor concentración de ácido vaccénico pero no de ruménico en la grasa láctea de vacas en lactancia temprana alimentadas con una RTM y con 6 o 9 h de acceso a una pastura, respecto a vacas alimentadas únicamente con RTM; además, las vacas con 9 h de acceso a pastura tuvieron una mayor concentración de ácido linolénico respecto a los demás tratamientos.

Efectos sobre la digestión y el metabolismo

La mayoría de los estudios citados hasta aquí se han focalizado en variables de tipo productivo, con menor atención hacia los procesos de fermentación en rumen, de digestión y metabolismo de los nutrientes, o de calidad de producto, cuyo conocimiento es imprescindible para comprender y eventualmente recomendar uno de estos sistemas de alimentación. En un experimento realizado por Bargo et al. (2002b) se reportó que la concentración de N-NH₃ ruminal fue menor en vacas alimentadas solo con RTM o con pastura y RTM, respecto a pastura y concentrado, aunque no se detectaron diferencias en pH (valor promedio = 5,87), concentración o perfil de AGV. Adicionalmente, las vacas alimentadas con RTM tuvieron el mayor consumo de energía, y las del tratamiento pastura y concentrado el menor, siendo el tratamiento pastura y RTM intermedio. Respecto a las vacas alimentadas con pastura y concentrado, las alimentadas con pastura y RTM tuvieron una menor concentración de urea en plasma y leche, lo que sugiere un mayor aprovechamiento del nitrógeno ingerido, y por otra parte, una menor concentración de ácidos grasos no esterificados en plasma, lo que sugiere un mejor balance de energía y una menor movilización de reservas corporales al incluir RTM en dietas con pasturas (Bargo et al., 2002a).

Salado et al. (2012c) realizaron un experimento con vacas lecheras, que fueron alimentadas con una dieta 100% RTM, o con inclusión progresiva de FF hasta un 75% de la MS consumida total. Los autores no reportaron efecto de los tratamientos en el pH, la concentración ruminal de N-NH₃ o de AGV, excepto la proporción de ácido butírico, que se incrementó a medida que aumentó el nivel de inclusión de FF

hasta un 50% de la MS consumida. Tampoco observaron efectos de los tratamientos sobre la digestibilidad ruminal de ensilaje de maíz, medida con la técnica de degradabilidad *in situ*.

Vibart et al. (2010), utilizando fermentadores *in vitro*, no observaron diferencias en el pH o concentración de N-NH₃ entre dietas 100% RTM o con distinta inclusión de FF, pero reportaron que el incremento de la proporción de raigrás anual en una dieta de tipo RTM (de 40 a 67%, base seca) resultó en aumento lineales en las concentraciones de AGV y en la digestibilidad total de la dieta, en una disminución de la producción de metano, y un aumento en la síntesis de proteína microbiana; estos resultados sugieren un mejor aprovechamiento del nitrógeno por los microorganismos del rumen a medida que aumentó la cantidad de pastura en la dieta. También usando una metodología *in vitro*, Soder et al. (2013) reportaron menores pH, concentraciones de N-NH₃, digestibilidad aparente de la fibra detergente neutro y digestibilidad verdadera de la materia orgánica en fermentadores alimentados solo con RTM respecto a solo con FF; sin embargo, la concentración total de AGV, y las proporciones molares de ácido acético y propiónico fueron mayores en los fermentadores con la dieta 100% RTM.

A nivel nacional, Santana et al. (2016) evaluaron en vaquillonas Angus x Hereford el efecto de la oferta a voluntad a un FF o una RTM durante todo el día, o una combinación de 6 h de acceso a dicho FF y acceso a la RTM durante el resto del día. Se reportó un mayor consumo de MS y energía en el tratamiento que combinaba RTM y FF respecto solo FF, lo que se reflejó en mayores concentraciones sanguíneas de glucosa e insulina en el primer tratamiento. Sin embargo, la digestibilidad de la MS y la fibra fue menor en los tratamientos que incluían RTM, lo que estuvo asociado a menores pH en rumen en dichos tratamientos.

En otro trabajo de nuestro equipo, se comparó la ingestión y la digestión de corderos en crecimiento consumiendo dietas RTM con diferentes niveles de incorporación de alfalfa fresca (Pérez-Ruchel, 2014). A diferencia de otros trabajos ya reportados, a medida que aumentó el nivel de FF en la dieta aumentó la ingesta total de MS, alcanzando incluso los mayores consumos los animales a los que se ofrecía sólo alfalfa. Además, la inclusión de alfalfa a la dieta aumentó el pH y la concentración de N-NH₃ a nivel ruminal, pero no hubo diferencias en el flujo de proteína microbiana a duodeno entre tratamientos. Sin embargo, la inclusión de alfalfa a la dieta aumentó la capacidad de fermentación ruminal cuando el líquido ruminal obtenido de cada animal fue usado como inóculo en pruebas de producción de gas *in vitro*.

Como fuera mencionado para la producción de leche, las diferencias entre experimentos respecto al impacto de las dietas que combinan RTM y pastura sobre variables de digestión y metabolismo seguramente se deben a factores múltiples. En este caso, las mismas se deberían no solo a variaciones en la cantidad o la composición química de la pastura o RTM usada en cada experimento, sino también a la metodología usada en cada uno (e.g. métodos *in vivo* respecto a métodos *in vitro*) e incluso la categoría o especie animal (e.g. bovinos respecto a ovinos; vaquillonas respecto a vacas lecheras).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante el período transcurrido entre 1992 y 2013 la producción de leche comercial en Uruguay creció a una tasa anual de 6%, dejando de ser un sector orientado únicamente a satisfacer la demanda interna a exportar más del 60% de la producción total de leche. Con un ingreso anual de producción leche a plantas industriales en 2013 de 2046 millones de litros, y un ingreso por exportaciones por casi 900 millones de dólares, el sector lechero es el 2º rubro pecuario más importante en términos económicos, solo superado por la ganadería de carne. Como contrapartida, el número de explotaciones, luego de mantenerse estable hasta mediados de la década del 80', se redujo drásticamente durante el período restante, pasando de 8900 tambos en 1980 a unos 4400 en 2013, si bien dicha tendencia se habría moderado en los últimos años (DIEA, 2014).

Este importante crecimiento de la producción lechera de los últimos años ocurrió en simultáneo con la expansión de otros rubros como la agricultura de secano y la forestación, lo que condujo a una fuerte competencia por el recurso suelo, y determinó una reducción en el área dedicada a la lechería, que pasó de alrededor de 1.000.000 ha en 2001 a 811.000 en 2013. Adicionalmente, el tamaño del rodeo lechero, y específicamente de las vacas en producción, se mantuvo relativamente estable en la última década (DIEA, 2014). Todo lo anterior indica que el incremento que tuvo la producción de leche en Uruguay en los últimos tiempos fue resultado de un proceso de intensificación de los sistemas lecheros. También sugiere que, como forma de mantener su competitividad, la estrategia de producción de los mismos debería apuntar a continuar intensificando el uso de los recursos disponibles, que permita un aumento de la producción por unidad de superficie, manteniendo los costos por unidad de producto controlados, y de manera sustentable con el ambiente.

La alimentación tiene un peso muy importante dentro de los costos de producción de leche (St-Pierre & Cobanov, 2007), y para los sistemas lecheros de Uruguay, un componente fundamental de la misma es el pastoreo directo de gramíneas y leguminosas forrajeras. Debido a que en nuestro país una alta proporción de las vacas pare en otoño e invierno, el comienzo de la lactancia, y por tanto de mayores requerimientos de nutrientes, coincide con el momento de menor oferta de pastura, debido al bajo crecimiento de la misma en estas estaciones. Incluso en situaciones donde el crecimiento de las pasturas es adecuado, es posible que las vacas no sean capaces de consumir los nutrientes necesarios para satisfacer todos sus requerimientos y así expresar su potencial genético, el cual además ha crecido de forma importante en los últimos años (Meikle et al., 2013). Por lo tanto, en estas situaciones es imprescindible el uso de suplementos, como concentrados o reservas forrajeras (henos o ensilajes), como forma de cubrir los requerimientos de nutrientes de los animales.

Tradicionalmente, los concentrados son ofrecidos dentro de la sala de ordeño, mientras que las reservas forrajeras se ofrecen fuera de la misma, en un patio o playa de alimentación, o bien sobre una pastura. Sin embargo, trabajos realizados en el país demuestran que, incluso con estas estrategias de suplementación, los animales generalmente no cubren totalmente sus requerimientos, y por tanto no pueden

explotar todo su potencial genético y ven resentido su desempeño tanto productivo como reproductivo (Meikle et al., 2004; Cavestany et al., 2005). Asimismo, y según la investigación nacional, incluso en los sistemas más intensivos ya se estarían explorando “techos” de producción a partir de la tecnología disponible, donde la oferta de pasturas que son suplementadas con concentrados y/o reservas forrajeras que se ofrecen en distinto momento del día ya no sería suficiente para seguir incrementando los niveles de producción (Durán, 2004). En particular, el incremento en la cantidad de suplemento ofrecido como forma de cubrir la demanda de vacas de alta producción puede causar problemas de salud a los animales, como la acidosis, que pueden comprometer la respuesta productiva de los mismos (Bramley et al., 2008), o reducir la eficiencia de utilización del alimento, con el consiguiente aumento de costos (Stockdale, 2010).

Por lo tanto, surge la necesidad de explorar nuevas alternativas de suplementación de vacas lecheras de alta producción manejadas en sistemas pastoriles, como una posible estrategia para continuar intensificando la producción. En este marco, y a partir de la información revisada en la literatura nacional e internacional, podría hipotetizarse que la utilización simultánea de una RTM balanceada (en términos de aporte de nutrientes) y FF, podría ser una alternativa promisorio al tradicional uso de concentrados y reservas forrajeras que se ofrecen por separado, como forma de alimentar al rodeo lechero. Por una parte, el uso de una RTM permitiría: a) una mayor precisión en la formulación de la dieta; b) ofrecer una dieta con un aporte balanceado de nutrientes; c) incrementar el consumo total de nutrientes, lo que permitiría incrementar la producción individual; d) lograr una mayor independencia de las variaciones climáticas, que son quienes determinan la producción de forraje de un predio. A su vez, la inclusión de FF permitiría: a) mantener altos niveles de compuestos considerados nutraceuticos, o con beneficioso sobre la salud humana (e.g. ácidos grasos insaturados), b) mantener costos bajos de producción, y c) aprovechar las ventajas intrínsecas que brinda la alimentación con FF en términos de bienestar de los animal. En conjunto, la posibilidad de implementar estrategias de alimentación que combinan RTM y FF permitiría incrementar la producción de leche de los tambos y el ingreso de los productores lecheros, respecto a estrategias más tradicionales de uso de los suplementos.

La variable concreta que se propone estudiar en este proyecto es el tiempo de acceso a un FF de alta calidad, ya que es una medida de manejo simple, que puede ser adoptada sin problemas por los productores lecheros. Hay que señalar que, si bien actualmente muchos productores durante situaciones de déficit de forraje, adoptan estrategias de alimentación del rodeo lechero que en muchas ocasiones incluyen algún tipo de combinación de alimentación a base de RTM y FF, a la fecha no existe información clara que permita orientar a los productores sobre la forma de implementar de forma óptima estas prácticas de alimentación.

HIPÓTESIS

La inclusión de un forraje fresco de alta calidad en la dieta de vacas alimentadas con una ración totalmente mezclada determinará cambios a nivel del comportamiento, la ingestión y digestión de los nutrientes, que se reflejarán en la producción y composición de la leche, así como en distintos metabolitos y hormonas indicadores del estado energético y proteico de los animales.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del tiempo de acceso a un forraje fresco de alta calidad sobre el aprovechamiento digestivo y metabólico de los nutrientes, y la producción de vacas lecheras alimentadas con una ración totalmente mezclada.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar, en vacas lecheras alimentadas con una ración totalmente mezclada, el efecto del tiempo de acceso a un forraje fresco de alta calidad sobre:

1. El comportamiento ingestivo
2. El consumo de nutrientes
3. La producción, la composición, y el perfil de ácidos grasos de la leche
4. La digestibilidad aparente de los nutrientes
5. La tasa de pasaje de la digesta
6. La fermentación ruminal y el flujo de nitrógeno microbiano a duodeno
7. La eficiencia bruta de uso de los nutrientes
8. La concentración plasmática de glucosa, urea, insulina y glucagón

ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

Para testear la hipótesis planteada, se diseñó un experimento que fue realizado con vacas en producción, con el objetivo de estudiar el efecto de dietas que combinan forraje fresco y ración totalmente mezclada sobre la producción y el aprovechamiento digestivo y metabólico de los nutrientes. Los resultados correspondientes a los objetivos específicos 2 y 3 fueron publicados en el siguiente artículo, que se presenta en los anexos como Publicación I.

Mendoza A, Cajarville C, Repetto JL. (2016). Short communication: Intake, milk production, and milk fatty acid profile of dairy cows fed diets combining fresh forage with a total mixed ration. *J Dairy Sci* 99:1938-1944.

Los resultados correspondientes a los objetivos específicos 4, 5, 6, 7 y 8 fueron publicados en el siguiente artículo, que se presenta en los anexos como Publicación II.

Mendoza A, Cajarville C, Repetto JL. (2016). Digestive response of dairy cows fed diets combining fresh forage with a total mixed ration. *J Dairy Sci* <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-11023> (aceptado para su publicación).

Los resultados correspondientes al objetivo específico 1 fueron enviados a publicar en el siguiente manuscrito, que se presenta en los anexos como Publicación III.

Mendoza A, Cajarville C, Repetto JL. (2016). Intake rate and behavior of dairy cows fed a total mixed ration and fresh forage. *New Zeal J Agric Res* (enviado, bajo revisión). Código de referencia del manuscrito: NZJA-2016-0192.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento reportado en esta tesis fue realizado en la Unidad de Digestión y Metabolismo Ruminal de los Departamentos de Bovinos y Nutrición Animal, sito en el Campo Experimental N°2 de Facultad de Veterinaria (Ruta 1, km 42,5) de la Universidad de la República (UDELAR). El mismo fue realizado de acuerdo a las normas establecidas por la Comisión Honoraria de Experimental Animal de la UDELAR. Los análisis de composición química de los alimentos fueron realizados en el Laboratorio de Nutrición Animal de Facultad de Veterinaria (UDELAR). Los análisis de hormonas y metabolitos en sangre fueron realizados en los Laboratorios de Técnicas Nucleares, y de Nutrición Animal de Facultad de Veterinaria (UDELAR). Los análisis de composición química y metabolitos en orina y heces fueron realizados en el Laboratorio de Nutrición Animal de Facultad de Veterinaria (UDELAR). Los análisis de composición de leche fueron realizados en el Laboratorio de Calidad de Leche de INIA “La Estanzuela”, y los análisis de cromo en heces fueron realizados en el Laboratorio de Suelos, Plantas y Agua de INIA “La Estanzuela”.

Animales y tratamientos

Se seleccionaron 9 vacas Holstein del rodeo del Campo Experimental, con experiencia previa de pastoreo, y que tenían cánulas a nivel ruminal. Las vacas fueron bloqueadas en 3 cuadrados de acuerdo a su peso vivo (572 ± 76 kg [media $\pm$ desvío estándar]), producción a 305 d en la lactancia previa (7079 ± 1226 kg), días en lactancia (100 ± 25) y paridad ($4,3 \pm 1,2$). Dentro de cada cuadrado, fueron asignadas al azar a secuencias de tratamientos de acuerdo a un diseño de Cuadrado Latino 3 x 3, replicado 3 veces. Cada período experimental tuvo una duración de 20 d, con los primeros 10 d dedicados a la adaptación de los animales a los tratamientos, seguidos de 10 d para la colecta de datos y muestras.

Los tratamientos evaluados compararon distintos tiempos de acceso a un forraje fresco (FF) en vacas alimentadas con una dieta base de ración totalmente mezclada (RTM), según se muestra a continuación:

T0: 0 h de acceso a FF y 24 h de acceso a RTM

T4: 4 h de acceso a FF y 20 h de acceso a RTM

T8: 8 h de acceso a FF y 16 h de acceso a RTM

Las vacas se alojaron en bretes individuales (2,0 x 1,3 m) con cama de arena, un comedero y un bebedero, ubicados en un establo con iluminación natural. Se ordeñaron dos veces al día, a las 0700 y 1800 h. Se formuló una única RTM para cubrir los requerimientos de una vaca de 600 kg produciendo 30 kg/d de leche, que fue ofrecida a todos los animales. El forraje (*Lolium multiflorum*; var. INIA Bakarat) usado en T4 y T8 fue obtenido del mismo potrero. Fue sembrado (15 kg/ha) el 3 de marzo de 2011 y fue fertilizado a la siembra con 27 kg/ha de N y 69 kg/ha de P como fosfato diamónico. El potrero fue dividido en 3 piquetes, y cada uno fue usado en cada período. Cada potrero fue cortado aproximadamente 30 d antes del inicio de cada período a una altura de 5 cm para permitir un período de rebrote similar; luego de cada corte se aplicaron 28 kg de N como urea. La disponibilidad de forraje

promedio para los 3 períodos fue 2413 ± 552 kg MS/ha. Todo el forraje usado en el experimento estaba en estado vegetativo, con una altura al ras de suelo de entre 20 y 25 cm. El forraje fue cortado diariamente con una segadora de discos, a una altura de 10 cm. Los ingredientes de la RTM, y la composición química de la RTM y el FF se presentan en el cuadro II.

Cuadro II. Ingredientes y composición de nutrientes (desvío estándar entre paréntesis) de la ración totalmente mezclada (**RTM**) y el forraje fresco (expresados como % de la materia seca (**MS**), salvo que se indique otra cosa)

Item	RTM	Forraje fresco
Ingredientes de la RTM		
Ensilaje de maíz	45,2	-
Grano de maíz molido	31,6	-
Harina de soja	21,3	-
Premezcla de aditivos ¹	1,94	-
Premezcla de vitaminas y minerales ²	0,04	-
Composición de nutrientes³		
MS, % tal cual ofrecido	35,8 (2,9)	15,3 (0,7)
MO	92,0 (0,3)	90,1 (0,2)
FDN	40,3 (3,3)	47,1 (2,6)
FDA	22,9 (0,8)	26,5 (2,2)
LDA	2,7 (0,3)	4,4 (0,7)
CNF	34,0 (3,0)	23,7 (2,1)
EE	1,8 (0,3)	2,3 (0,1)
PC	16,1 (0,3)	17,1 (0,9)
NIDN	0,55 (0,07)	1,32 (0,07)
NIDA	0,19 (0,02)	0,23 (0,04)
EN _L , Mcal/kg de MS	1,55 (0,04)	1,46 (0,01)
Distribución del tamaño de partículas, % en base fresca		
> 19 mm	2,8 (0,9)	-
8 to 19 mm	50,5 (0,3)	-
1,8 to 8 mm	40,4 (1,5)	-
< 1,8 mm	6,3 (0,3)	-

¹Proveyó (por kg de MS): 6 g de bicarbonato de sodio, 4 g de fosfato dicálcico, 3 g de urea, 2 g de carbonato de calcio, 2 g de sal, 2 g de óxido de magnesio, y 0,4 g de un adsorbente de micotoxinas.

²Proveyó (por kg de MS): 0,85 g de Cu, 2,6 g de Zn, 0,9 g de Se, 1,0 g de Mn, 23 mg de I, 3 mg de Co, 63700 UI de vitamina A, 12700 UI de vitamina D, y 250 UI de vitamina E.

³MO = materia orgánica; FDN = fibra detergente neutro; FDA = fibra detergente ácido; LDA = lignina detergente ácido; CNF = carbohidratos no fibrosos; EE = extracto al éter; PC = proteína cruda; NIDN = nitrógeno insoluble en detergente neutro; NIDA = nitrógeno insoluble en detergente ácido; EN_L = energía neta para lactancia

El FF fue ofrecido sin picar a los animales en los tratamientos T4 y T8 entre las 0800 y 1200 h, y entre las 0800 y 1600 h, respectivamente. Para asegurar que la disponibilidad de alimento no fuera limitante en ningún momento, el comedero fue periódicamente revisado cada 30 min, y se agregó más alimento en caso de ser necesario. De 1200 a 0800 h, y de 1600 a 0800 h, las vacas T4 y T8, respectivamente, tuvieron acceso a la RTM, que fue ofrecida de la misma forma que para el FF. Las vacas T0 tuvieron acceso *ad libitum* a RTM todo el día. Cada día, a

las 0800 h (que de aquí en más será referido como hora 0), el alimento remanente de las 24 h previas fue retirado del comedero, y nuevo alimento fue ofrecido (RTM o FF, dependiendo del tratamiento).

La información meteorológica fue obtenida de una estación meteorológica situada a 18 km del sitio experimental. Las temperaturas medias medidas a una altura de 2 m durante el período 1, 2 y 3 fueron 8,5, 9,5 and 11,0 °C, respectivamente. La salida del sol ocurrió a las 0753 y la puesta de sol ocurrió a las 1742 h en el primer día del período 1, y en el último día del período 3, la salida de sol ocurrió a las 0717 h y la puesta de sol a las 1819 h. Las luces en el establo fueron encendidas desde el atardecer (aproximadamente a las 1800 h) hasta las 2100 h.

Mediciones

Comportamiento

El día 11 de cada período, los comportamientos fueron registrados por 3 observadores usando un muestreo instantáneo de vacas individuales con intervalos de registro de 5 minutos (Martin & Bateson, 1993) durante 12 h consecutivas a partir de las 0800 h, lo que resultó en 144 observaciones por vaca y período. El intervalo entre puntos de muestreo fue tomado de Hirata et al. (2002). Cada observador registró los comportamientos de las 9 vacas simultáneamente, durante 4 h consecutivas. Los 3 observadores fueron entrenados juntos antes del comienzo de cada período para que se familiarizaran con el etograma usado en el experimento, y para evaluar la consistencia entre observadores en la evaluación de los comportamientos, que se definieron de la siguiente forma: come (i.e. tomar con la boca y masticar RTM o FF), rumia (i.e. masticar bolos de alimento regurgitados), bebe (i.e. poner la boca en el bebedero e ingerir agua) y otros (i.e. no se demuestra ninguno de los comportamientos anteriores). La proporción de cada evento de comportamiento por hora fue calculado como una fracción del total de observaciones. Debido a la baja proporción de “bebe” ($< 0,02$), este comportamiento fue incluido en “otros”.

Consumo

En cada período, el consumo diario fue medido entre el día 13 y 20 por diferencia de peso entre la cantidad de alimento ofrecido y rechazado. Antes de las 0800 h, la cantidad de RTM rechazada por las vacas en todos los tratamientos fue pesada, y a las 1200 y 1600 h, la cantidad de FF rechazado en los tratamientos T4 y T8, respectivamente, fue pesada. Se tomaron muestras de RTM y FF ofrecidos a las 0800, 1200 y 1600 h, y se conformó una muestra compuesta por día. Para las muestras de RTM, se evaluó la distribución del tamaño de partículas usando un separador de partículas de Penn State (Kononoff et al., 2003) (Cuadro II). Aproximadamente 20% de los rechazos de alimentos (RTM o FF) de cada vaca fueron muestreados. Todas las muestras fueron congeladas a -20 °C hasta su posterior análisis. En el día 12 de cada período, la tasa de consumo de MS (**TCMS**) fue calculada como la diferencia entre la cantidad de alimento ofrecido y rechazado, que fue medido a cada hora durante 12 h consecutivas a partir de las 0800 h. Cada vez que se realizó esta medición se hizo en menos de 1 minuto para evitar interferir con el comportamiento ingestivo de los animales. Para calcular la TCMS, se determinó el

contenido de MS en muestras de alimentos tomadas cada 2 h entre las 0800 y las 1800 h, para considerar los posibles cambios en el contenido de MS de los alimentos. El contenido de MS de cada muestra fue usado para estimar la MS de cada alimento ofrecido durante las siguientes 2 h. El consumo de agua fue medido por entre los días 11 y 13 de cada período por diferencia de peso entre la cantidad de agua ofrecida y rechazada. El consumo total de agua fue calculado como la suma del consumo de agua de bebida más el consumo de agua a partir de cada alimento.

Todas las muestras de alimento ofrecido y rechazado fueron secadas en estufa de aire forzado a 60 °C y luego fueron molidas con una malla de 1 mm en un Molino Wiley (Arthur H. Thomas Co., Philadelphia, EEUU). Las muestra de alimentos fueron analizadas para MS, cenizas, nitrógeno total y EE (AOAC, 1990; métodos ID 934.01, ID 942.05, ID 955.04, ID 920.39, respectivamente), fibra detergente neutro (**FDN**; usando α -amilasa termo-estable y sulfito de sodio), fibra detergente ácido (**FDA**) y lignina detergente ácido (**LDA**) (Van Soest et al., 1991), expresados sin ceniza residual, y nitrógeno insoluble en detergente neutro (**NIDN**) y ácido (**NIDA**) (Licitra et al., 1996). El contenido de proteína cruda (**PC**) fue estimado como $N \times 6,25$. El contenido de MO fue estimado como la diferencia entre la MS y el contenido de cenizas. La concentración de carbohidratos no fibrosos (**CNF**) se estimó como $100 - (\% \text{ FDN} + \% \text{ PC} + \% \text{ EE} + \% \text{ cenizas})$ (NRC, 2001). La concentración de EN_L de cada alimento fue calculada de acuerdo al NRC (2001) usando información de la composición química de los alimentos, del consumo real y de las características individuales de cada vaca en cada período.

El balance de energía (**BE**) diario fue estimado entre el día 13 y 20 de cada periodo como $BE \text{ (Mcal } EN_L/d) = \text{consumo de energía (Mcal } EN_L/d) - [\text{requerimiento de mantenimiento (Mcal } EN_L/d) + \text{requerimiento de lactancia (Mcal } EN_L/d)]$. El consumo de energía fue calculado como: consumo de MS x concentración de EN_L en los alimentos. Los requerimientos de energía fueron calculados según el NRC (2001). De manera resumida, los requerimientos para mantenimiento se calcularon como: $0,08 \times \text{peso vivo}^{0,75}$. El peso vivo de cada animal fue medido con una balanza digital al inicio y al final de cada período, y el promedio para cada período fue usado en los cálculos. El requerimiento para lactancia fue calculado como: producción de leche $\times (0,0929 \times \% \text{ grasa} + 0,0547 \times \% \text{ proteína} + 0,0395 \times \% \text{ lactosa})$, usando los valores promedio de composición de leche para cada período, según se describe en el siguiente capítulo. Los requerimientos para gestación y crecimiento no fueron considerados debido a que las vacas no estaban gestando y se encontraban al menos en su tercera lactancia. La eficiencia bruta de uso de la energía para producción de leche fue calculada como: rendimiento de EN_L en leche/consumo de EN_L .

Producción y composición de leche

La producción de leche fue registrada diariamente en cada período. La producción de leche corregida por grasa al 3,5% (**LCG**) fue calculada según Tyrrell & Reid (1965), y la eficiencia bruta de uso del alimento para producción de leche fue calculada como: $LCG/\text{consumo de MS}$. Entre el día 14 y 19 de cada período, se obtuvieron muestras individuales de leche de cada ordeño con bronopol como conservante. Las muestras se almacenaron a 4 °C hasta 6 h y fueron usadas para determinar el contenido de grasa, proteína, caseína total, lactosa y N ureico por análisis de infra-

rojo medio con un equipo Bentley Model 2000 (Bentley Instruments Inc., Chaska, EEUU). Se tomaron 2 muestras adicionales de leche (sin conservante) en ambos ordeños del día 14 de cada período, que fueron almacenadas a -20 °C hasta ser analizadas para determinar el perfil de ácidos grasos.

Para el análisis de los ácidos grasos de la leche, las muestras se dejaron descongelar a temperatura ambiente, y los lípidos de la leche se separaron de acuerdo a la técnica propuesta por Feng et al. (2004). Brevemente, 20 mL de leche fueron centrifugados a 17.800 g durante 30 minutos a 4°C. La capa de grasa fue transferida a un microtubo y se dejó a temperatura ambiente durante 20 a 30 minutos hasta que se derritió, siendo luego centrifugado a 19.300 g durante 20 min a temperatura ambiente. Luego, la capa superior de grasa fue colectada para su posterior análisis. Una alícuota de 50 mg de grasa de leche fue disuelta en 100 µL de hexano, seguido por la esterificación con 100 µL de hidróxido de potasio 2N en metanol, para obtener los ésteres metílicos de ácidos grasos. Para la determinación del perfil de ácidos grasos se usaron 10 µL de la capa superior. Los ésteres metílicos de ácidos grasos fueron separados y cuantificados usando un cromatógrafo de gases (Agilent 7890A GC System, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, EEUU) equipado con un detector de espectrometría de masa de impacto de electrones (Agilent 5975C MSD) y una columna capilar de 60 m de 70% cianopropil (equiv) polisilfenilen-siloxano (250-µm i.d., espesor del film de 0,25-µm; Thermo Scientific Inc, Marietta, EEUU). El gas portador fue helio, y la tasa de flujo a través de la columna fue 1,0 mL/min. La temperatura del inyector (con una relación de corte de 100:1) se fijó en 250 °C. Se usó el siguiente gradiente de temperatura: la temperatura inicial de la columna (40 °C) se mantuvo por 0,5 min y luego se incrementó a 25°C/min hasta 175 °C, se mantuvo por 10 min y luego se incrementó a 5°C/min hasta 210°C, se mantuvo por 5 min y luego se incrementó a 5°C/min hasta 230°C, y luego se mantuvo por 5 min. Los ácidos grasos se identificaron comparando sus tiempos de retención con los siguientes estándares de ésteres metílicos de ácidos grasos: 37 Component FAME Mix (47885, Supelco, Bellefonte, EEUU), trans-11-octadecenoic methyl ester (46905-U, Supelco, Bellefonte, PA), y octadecadienoic acid, conjugated methyl ester (O5632, Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU), y aquellos almacenados en la biblioteca del NIST (National Institute of Standards and Technology, US Government library). Los ácidos grasos se reportaron como g por cada 100 g de ácidos grasos total. El índice Δ^9 -desaturasa se calculó de la forma descrita por Kelsey et al. (2003), y el índice de aterosogenicidad se calculó de la forma descrita por Ulbricht & Southgate (1991).

Digestibilidad

Durante los días 12 y 13 de cada período, se tomaron 2 muestras puntuales de heces de cada vaca, a las 0200 y 1400 h (aproximadamente $\pm$ 4 h respecto al comienzo de la primera sesión de alimentación diaria). Se colectaron 200 g de heces directamente del recto, que fueron secados en una estufa de aire forzado a 60 °C durante 72 h. Las muestras se molieron con una malla de 1 mm en un Molino Wiley (Arthur H. Thomas Co., Philadelphia, EEUU), y se formó una muestra compuesta por vaca y período mezclando cantidades iguales de MS de cada sub-muestra. Las muestras compuestas de heces fueron analizadas para MS, cenizas, FDN, FDA y N total de la forma descrita previamente. Las muestras compuestas de heces, junto a muestras de RTM y FF (tanto ofrecidas como rechazadas), también fueron analizadas para

determinar la concentración de FDN indigestible (**FDNi**), para estimar la digestibilidad aparente de los nutrientes en todo el tracto digestivo, de la forma descrita por Huhtanen et al. (1994). De forma resumida, las muestras secas de heces, RTM y FF fueron molidas con una malla de 2 mm, y 6 g de cada muestra se pusieron en bolsas de nylon (Ankom Technology Corporation, Macedon, EEUU) de 22 x 10,5 cm, con un tamaño de poros de 50 µm, y una relación entre el tamaño de muestra y el área de la bolsa de 13 mg/cm². Todas las bolsas se incubaron por 288 h consecutivas en el rumen de 2 vacas secas que consumían una dieta consistente en (datos expresados en base seca): heno de *Setaria italica* (60%), grano de maíz con alta humedad (25%), harina de soja (13%) y una mezcla de vitaminas y minerales (2%). Luego de la incubación, las bolsas se lavaron con agua durante 15 min, y se secaron en estufa de aire forzado a 60 °C por 72 h. Se determinó el contenido de FDN en los residuos de la forma ya descrita. La emisión de heces fue estimada para cada animal como: consumo diario de FDNi/concentración de FDNi en heces. Los coeficientes de digestibilidad aparente para MS, MO, FDN, FDA y N total se calcularon como: $[(\text{ingestión (g/d)} - \text{excreción en heces (g/d)})/\text{ingestión (g/d)}] \times 100$.

Tasa de pasaje

La tasa de pasaje de partículas largas se estimó usando fibra marcada con Cr. La fibra marcada con Cr se preparó a partir de heno de alfalfa de la forma sugerida por Udén et al. (1980), resultando en un material con 1,99% de Cr (base seca). Las dietas experimentales no aportaban Cr suplementario. En el día 14 de cada período, a las 0800 h, 150 g de la fibra marcada se administraron de forma oral a cada animal en una única dosis, y se tomaron muestras de heces directamente del recto a las horas 0, 6, 9, 12, 24, 30, 34, 38, 42, 48, 60, 72, 96, 120 y 144 luego de la dosificación del marcador. Las muestras de heces fueron congeladas a -20°C hasta su posterior análisis. Una vez descongeladas a temperatura ambiente, las muestras se secaron en una estufa de aire forzado a 60 °C y se molieron con una malla de 1 mm en un Molino Wiley (Arthur H. Thomas Co., Philadelphia, EEUU). Las muestras se usaron para determinar la concentración de Cr en un espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin Elmer 3300, Perkin Elmer, Wellesley, EEUU) según el método de Williams et al. (1962). Las curvas individuales de excreción de Cr se ajustaron al siguiente modelo de compartimientos múltiples propuesto por Dhanoa et al. (1985):

$$Y = A \times \exp(-k_1 \times T) \times \exp\{-(n-2) \exp[-(k_2 - k_1) T]\}$$

donde Y (mg/kg MS) es la concentración del marcador en heces al tiempo t (h); T = t – TT donde TT es el tiempo de tránsito o tiempo de retraso (h) entre la administración del marcador y su primera aparición en heces; k₁ (h⁻¹) es la tasa de pasaje desde el retículo-rumen; k₂ (h⁻¹) es la tasa de pasaje desde el ciego-colon; A es un parámetro de escala dependiente de k₁; y N es el número de compartimiento en el modelo. El tiempo medio de retención en retículo-rumen (**TMRR**) y en ciego-colon (**TMRC**) fueron calculados como 1/k₁ and 1/k₂, respectivamente. El tiempo medio de retención total (**TMRT**) fue calculado como TMRT = TMRR + TMRC + TT (Colucci et al., 1990).

Fermentación en rumen

Durante el día 19 de cada período, se tomaron muestras de líquido ruminal de cada vaca a cada hora durante 24 h consecutivas. El líquido ruminal fue obtenido de distintos sitios del rumen, y fue filtrado a través de 2 capas de tela de quesería. El pH fue medido inmediatamente usando un pH-metro digital (EW-05991-36, Cole Parmer, Vernon Hills, EEUU). Una muestra de 10 mL de líquido ruminal fue conservada en 0,2 mL de H_2SO_4 6,6 M para realizar análisis de N-NH_3 , y otra muestra de 0,5 mL fue conservada con 0,5 mL de HClO_4 0,1 M para realizar análisis de AGV. Todas las muestras se almacenaron a -20°C hasta ser analizadas. Para la determinación de N-NH_3 las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente y analizadas por destilación directa usando tetraborato de sodio y titulación con HCl 0,05 M (Preston, 1995). Para la determinación de AGV solo se usaron las muestras obtenidas a las horas 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12. Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente, fueron centrifugadas a 10.000 g a 4°C por 15 minutos, y analizadas en un equipo HPLC (Dionex Ultimate 3000, Sunnyvale, EEUU) de la forma descrita por Adams et al. (1984), usando una columna Acclaim Rezex Organic Acid H+ (8%), de 7,8 x 300 mm, y ajustada a 210 nm. Las concentraciones de ácido acético, propiónico y butírico se reportaron en unidades de concentración y como proporciones molares, considerando a los AGV totales como la suma de las concentraciones de ácidos acético, propiónico y butírico.

Flujo de nitrógeno microbiano a duodeno y utilización del nitrógeno

Durante los días 12 y 13 de cada período, se tomaron 2 muestras puntuales de orina de cada vaca, a las 0200 y 1400 (aproximadamente ± 4 h respecto al comienzo de la primera sesión de alimentación diaria). La orina fue obtenida por estimulación sub-vulvar, y cada muestra de 15 mL fue acidificada con 60 mL de H_2SO_4 0,072 N, y fueron almacenadas a -20°C . Las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente, filtradas con un filtro de papel Whatman 1, y se usaron para determinar la concentración de derivados de purinas (**DP**): alantoína y ácido úrico, de la forma descrita por Balcells et al. (1992). Se usó un equipo HPLC (Dionex Ultimate 3000, Sunnyvale, EEUU), usando una columna Acclaim, C18, 5 μm , con una columna 4,5 x 250 mm ajustada a 205 nm. La concentración de alantoína en leche no se analizó. Las muestras de orina también fueron analizadas para determinar la concentración de creatinina con una kit comercial (Wiener Laboratorios, Rosario, Argentina) en un equipo Vitalab Selectra 2 Autoanalyser (Vital Scientific, Dieren, Países Bajos). El coeficiente de variación intra-ensayo fue menor a 10%. La cantidad de DP excretadas (mmol/d) se calculó como el cociente entre las concentraciones de DP y creatinina en las muestras puntuales, multiplicado por la excreción de creatinina, que se estimó asumiendo una tasa de excreción diaria de creatinina de 29 mg/kg de peso vivo (Valadares et al., 1999).

El flujo de N microbiano (g/d) a duodeno fue estimado de la forma descrita por Chen y Gomes (1992), excepto que se usó una relación de N en purinas / N microbiano de 0,134 (Valadares et al., 1999). La eficiencia de uso de N para la síntesis de N microbiano fue calculado como: (flujo de N microbiano/consumo total de N) x 100. La eficiencia bruta de uso del N alimentario para producción de leche se calculó como: (excreción de N en leche/consumo total de N) x 100. El contenido de N en

leche se estimó como: % proteína en leche/6,38 (NRC, 2001). Las muestras compuestas de orina por vaca y período fueron analizadas para determinar su contenido de N de la forma ya descrita para estimar la excreción urinaria de N.

Metabolitos y hormonas en sangre

Durante el día 20 de cada período, se tomaron muestras de sangre por veno-punción yugular a las horas 0, 2, 4, 6, 8 and 10, en tubos sin conservantes. Los tubos se dejaron a temperatura ambiente durante 2 h, luego se pusieron en un refrigerador a 4°C por 1 h más, y luego fueron centrifugadas (3000 g durante 20 min a temperatura ambiente), y se separó el suero, que fue almacenado a -20 °C hasta determinar la concentración de insulina y urea. Otra muestra de sangre fue colectada en tubos con Na₂-EDTA (Wiener Laboratorios, Rosario, Argentina), a los que inmediatamente se agregó aprotinina (500 KIU/mL of blood; Laboratorio Rivero, Buenos Aires, Argentina) y se mezcló suavemente. Los tubos se mantuvieron en hielo hasta ser centrifugados a 3000 g por 20 minutos a temperatura ambiente. El plasma se colectó y se almacenó a -20°C hasta determinar la concentración de glucagón. Una muestra adicional fue colectada en tubos con NaF y Na₂-EDTA (Wiener Laboratorios, Rosario, Argentina), que se centrifugaron inmediatamente a 3000 g durante 20 minutos, luego de lo cual el plasma fue separado y almacenado a -20°C hasta determinar la concentración de glucosa. Las concentraciones de urea en suero y glucosa en plasma se determinaron con un espectrofotómetro (Unico S1200, United Products & Instruments Inc, Dayton, NJ) usando kits comerciales (urea: urease/salicilate; BioSystems S.A., Barcelona, España; glucosa: glucose oxidase/peroxidase; BioSystems S.A., Barcelona, España). El coeficiente de variación intra-ensayo para los controles bajo y alto fue menor de 10% en ambos análisis. Las concentraciones de insulina fueron determinadas con un ensayo inmunoradiométrico (Diasource Immuno Assays, Nivelles, Bélgica), y el coeficiente de variación intra-ensayo fue 6,8% y 9,5% para los controles bajo (28,2 µUI/mL) y alto (103,4 µUI/mL), respectivamente. La concentración de glucagón en plasma se determinó con un radio-inmunoensayo secuencial (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Los Angeles, EEUU), y el coeficiente de variación intra-ensayo fue 8,5% y 12,9% para los controles bajo (66,6 pg/mL) y alto (235,4 pg/mL), respectivamente.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos fue realizado con el software SAS (versión 9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC). Los datos de consumo de MS y nutrientes, la producción y composición de leche, la eficiencia de uso de los nutrientes se promediaron por período antes de su análisis. Estos resultados, junto a los de BE, digestión de nutrientes, flujo de N microbiano y tasa de pasaje, fueron analizados usando el procedimiento PROC MIXED con el siguiente modelo:

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

donde Y_{ijkl} es la variable dependiente; C_i es el efecto aleatorio del cuadrado ($i = 1$ a 3); $V_j(C_i)$ es el efecto aleatorio de la vaca anidada en el cuadrado ($j = 1$ a 3); P_k es el efecto aleatorio del período ($k = 1$ a 3); T_l es el efecto fijo del tratamiento ($l = T0, T4$ o $T8$); y e_{ijkl} es el error residual.

Los datos de comportamiento, tasa de consumo, pH, N-NH₃ y AGV ruminal, y las variables medidas en sangre, fueron analizadas usando el PROC MIXED con el siguiente modelo:

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

donde Y_{ijklm} es la variables dependiente; C_i es el efecto aleatorio del cuadrado ($i = 1$ a 3); $V_j(C_i)$ es el efecto aleatorio de la vaca anidada en el cuadrado ($j = 1$ a 3); P_k es el efecto aleatorio del período ($k = 1$ a 3); T_l es el efecto fijo del tratamiento ($l = T0, T4$ o $T8$); H_m es el efecto fija de la hora de medición ($m = 0, 1, 2, \dots, 12$ para variables de comportamiento y TCMS; $m = 0, 1, 2, \dots, 23$ para pH y N-NH₃; $m = 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12$ para AGV; $m = 0, 2, 4, 6, 8, 10$ para variables medidas en sangre); $T_l \times H_m$ es el efecto fijo de la interacción entre el tratamiento y la hora de medición; y e_{ijklm} es el error residual. Las medidas repetidas se realizaron sobre el período x vaca dentro de cuadrado. Se usó una estructura de covarianza de tipo AR(1) (Littell et al. 1998). El efecto tratamiento x período se evaluó en ambos modelos pero no fue significativo y por tanto se eliminó. Se testeó la normalidad de los residuales con el PROC UNIVARIATE. Las medias se separaron con el test de Tukey, y las diferencias se consideraron significativas si $P \leq 0,05$, y se discutieron las tendencias si $0,05 < P \leq 0,10$.

RESULTADOS

Los resultados de comportamiento y TCMS se presentan en el cuadro III. El incremento en el tiempo de acceso al FF no tuvo efecto sobre la proporción de tiempo dedicado a comer, rumiar, o realizar otras actividades. Sin embargo, se detectó un efecto de la hora de medición, y una interacción tratamiento por hora de medición. En este sentido, la distribución de las actividades a lo largo del período de observación varió dependiendo si las vacas tuvieron acceso o no al FF. En la primera hora luego del inicio de la primera sesión de alimentación todas las vacas dedicaron una alta proporción del tiempo disponible a comer, que disminuyó hacia la hora 4. Luego, las vacas T0 tuvieron una proporción de tiempo dedicada a comer más estable, que varió entre 0,25 y 0,55 (Figura 2). En contraste, las vacas T4 y T8 mostraron un marcado incremento en la proporción de tiempo dedicada a comer, y una disminución en la proporción de tiempo dedicada a rumiar y realizar otras actividades, cuando se les ofreció RTM luego de 4 u 8 h de acceso al FF, respectivamente. Hasta ese momento, las vacas T8 dedicaron una baja proporción del tiempo disponible a comer, y una alta proporción a rumiar y realizar otras actividades.

Cuadro III. Comportamientos (expresados como proporción del total de observaciones realizadas por animal), y tasa de consumo de materia seca (TCMS) durante las primeras 12 h luego del inicio de la primera sesión de alimentación a las 0800 h

Item	Tratamiento ¹				Valor de <i>P</i>		
	T0	T4	T8	EEM ²	Tratamiento	Hora	Tratamiento x hora
Comportamientos							
Come	0,43	0,46	0,41	0,026	0,396	<0,001	<0,001
Rumia	0,25	0,25	0,26	0,024	0,938	<0,001	<0,001
Otros	0,31	0,28	0,32	0,023	0,187	<0,001	0,010
TCMS, kg/h	1,6 ^a	1,8 ^a	1,2 ^b	0,27	0,002	<0,001	<0,001
Todo la sesión	1,6 ^a	1,8 ^a	1,2 ^b	0,27	0,002	<0,001	<0,001
Solo acceso a FF	-	0,8 ^a	0,5 ^b	0,10	<0,001	-	-
Solo acceso a RTM	1,6 ^b	2,2 ^a	2,5 ^a	0,40	0,011	-	-

^{a, b} Dentro de una fila, medias con distintas letras difieren ($P \leq 0,05$).

¹ T0 = 24 h de acceso a ración totalmente mezclada; T4 = 4 h de acceso a forraje fresco y 20 h de acceso a ración totalmente mezclada; T8: 8 h de acceso a forraje fresco y 16 h de acceso a ración totalmente mezclada.

² Error estándar de la media.

Se detectó un efecto del tratamiento, hora de medición, e interacción tratamiento x hora de medición para la TCMS. Las vacas T0, luego de tener una alta TCMS al inicio de la primera sesión de alimentación diaria, mantuvieron una TCMS estable y menor durante el restante tiempo del período de observación (entre 1,0 y 1,9 kg/h) (Figura 2). En contraste, la TCMS fue baja cuando los animales tuvieron acceso al FF, y se incrementó cuando se cambió este alimento por RTM. Las vacas T4 mantuvieron una alta TCMS (entre 2 y 4 kg/h) por más tiempo que T0 luego que pasaron a consumir RTM, pero este comportamiento no fue observado en las vacas

T8, quienes mantuvieron una TCMS comparable solo en la hora siguiente al cambio de alimentación.

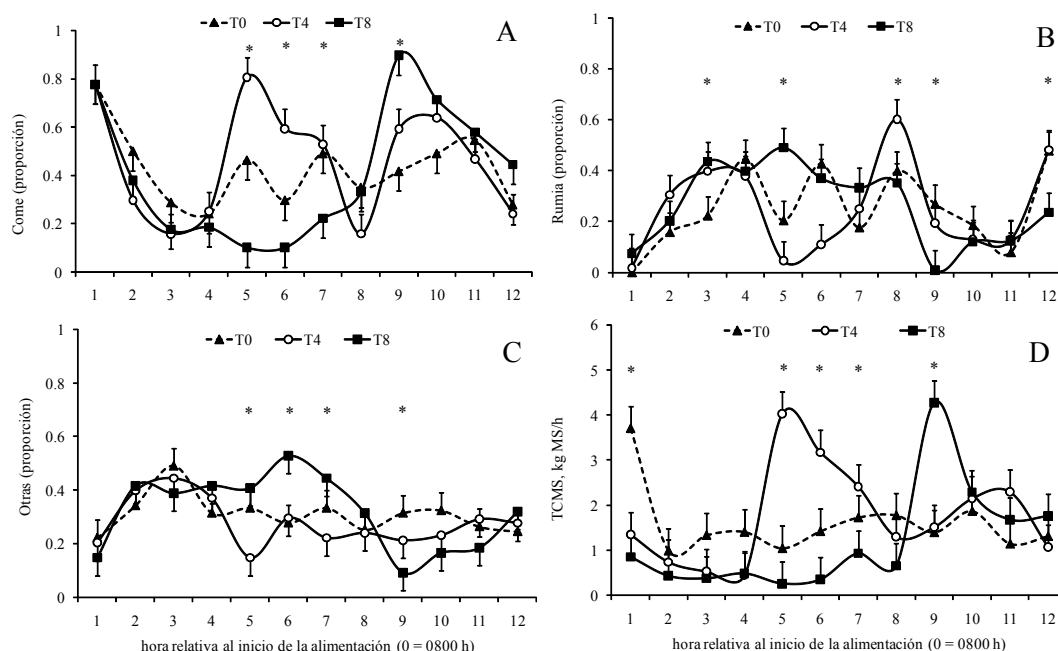


Figura 2. Comportamiento de comer (A), rumiar (B) o realizar otras actividades (C), expresados como proporción del total de observaciones, y tasa de consumo de material seca (TCMS) (D). Los asteriscos en cada hora indican la existencia de al menos una diferencia entre tratamientos ($P \leq 0,05$). T0 = 24 h de acceso a ración totalmente mezclada; T4 = 4 h de acceso a forraje fresco y 20 h de acceso a ración totalmente mezclada; T8: 8 h de acceso a forraje fresco y 16 h de acceso a ración totalmente mezclada. El forraje fresco fue ofrecido a partir de las 0800 h (inicio de la primera sesión de alimentación).

Los resultados de consumo de MS y nutrientes se presentan en el cuadro IV. El consumo de MS de FF aumentó a mayor tiempo de acceso al mismo, representando 11 y 16% del consumo total de MS en T4 y T8, respectivamente, mientras que el consumo de RTM fue mayor en T0 y T4 que en T8. El consumo total de MS fue mayor en T4 que T8, pero T4 no difirió de T0, mientras que el consumo de MO, PC, CNF y ENL fue mayor en T0 y T4 que T8. El consumo de FDN y EE tendió a ser mayor en T4 respecto a T8, pero no difirió de T0. El consumo de MS durante las primeras 4 h luego del inicio de la primera sesión de alimentación, expresado como porcentaje del consumo total de MS diario, fue mayor en T0 respecto a T4 y T8, y entre las horas 4 y 8 fue mayor en T0 y T4 respecto a T8. Las vacas T8 alcanzaron un mayor porcentaje del consumo total de MS diario entre las horas 8 y 12 luego del inicio de la primera sesión de alimentación diaria (coincidiendo con el cambio de alimentación a RTM), y entre las horas 12 y 24, respecto a los demás tratamientos. El consumo de agua de bebida fue mayor en T0 y T4 respecto a T8, mientras que el

consumo de agua de alimentos fue mayor en T4 y T8 respecto a T0. El consumo total de agua fue mayor en T4 que T8.

Cuadro IV. Consumo de material seca (MS), nutrientes y agua

Item	Tratamiento ¹			EEM ²	Valor de <i>P</i>
	T0	T4	T8		
Consumo de MS, kg/d					
Forraje fresco	0 ^a	2,8 ^b	3,6 ^c	0,48	<0,001
Ración totalmente mezclada	24,5 ^a	22,8 ^a	19,0 ^b	1,54	0,002
Total	24,5 ^{ab}	25,6 ^a	22,6 ^b	1,58	0,048
Porcentaje de forraje fresco en la MS total consumida	0 ^a	10,9 ^b	16,4 ^c	1,54	<0,001
Porcentaje de la MS total consumida entre distintas horas luego de la 1ª sesión de alimentación (hora 0 = 0800 h)					
0 y 4 h	30,1 ^a	11,7 ^b	9,4 ^b	1,84	< 0,001
4 y 8 h	24,0 ^b	42,6 ^a	9,7 ^c	3,66	< 0,001
8 y 12 h	22,5 ^b	27,2 ^b	43,9 ^a	6,12	0,001
12 y 24 h	23,4 ^b	18,5 ^b	37,0 ^a	8,63	0,009
Consumo de nutrientes ³					
MO, kg/d	22,9 ^a	23,8 ^a	20,9 ^b	1,52	0,045
PC, kg/d	4,2 ^a	4,3 ^a	3,8 ^b	0,24	0,046
FDN, kg/d	9,7 ^{xy}	10,4 ^x	9,2 ^y	0,44	0,079
FDA, kg/d	5,6 ^{ab}	5,9 ^a	5,3 ^b	0,38	0,040
CNF, kg/d	8,6 ^a	8,6 ^a	7,5 ^b	0,88	0,015
EN _L , Mcal/d	39,1 ^a	40,4 ^a	35,4 ^b	1,76	0,037
Composición de la dieta consumida					
MO, % MS	93,5 ^a	92,9 ^b	92,6 ^b	0,39	<0,01
PC, % MS	17,2 ^x	16,9 ^y	16,8 ^y	0,16	0,09
FDN, % MS	39,6 ^b	40,6 ^a	40,8 ^a	2,66	<0,01
FDA, % MS	22,8 ^b	23,1 ^{ab}	23,5 ^a	0,53	0,03
CNF, % MS	35,1 ^a	33,6 ^b	33,1 ^c	2,50	<0,01
EN _L , Mcal/kg MS	1,60 ^a	1,58 ^b	1,57 ^b	0,03	<0,01
Consumo de agua, L/d					
Bebida	65,0 ^a	63,5 ^a	48,5 ^b	5,40	0,008
Forraje fresco	0 ^c	15,1 ^b	19,4 ^a	2,43	<0,001
Ración totalmente mezclada	41,5 ^a	39,5 ^a	33,5 ^b	3,60	0,003
Alimentos	41,5 ^b	54,5 ^a	52,9 ^a	3,86	<0,001
Total	106,5 ^{ab}	118,0 ^a	101,4 ^b	8,94	0,044

^{a-c}Dentro de una fila, medias con distintas letras difieren ($P \leq 0,05$).

^{x,y}Dentro de una fila, medias con distintas letras difieren ($0,05 < P \leq 0,10$).

¹T0 = 24 h de acceso a ración totalmente mezclada; T4 = 4 h de acceso a forraje fresco y 20 h de acceso a ración totalmente mezclada; T8: 8 h de acceso a forraje fresco y 16 h de acceso a ración totalmente mezclada.

²Error estándar de la media.

³MO = materia orgánica; PC = proteína cruda; FDN = fibra detergente neutro; FDA = fibra detergente ácido; CNF = carbohidratos no fibrosos; EN_L = energía neta para lactancia.

Los resultados de producción y composición de leche, y de eficiencia bruta de uso del alimento para producción de leche y el BE se presentan en el cuadro V. No hubo diferencias en producción o composición de leche entre T0 y T4. Sin embargo, un tiempo de acceso diario de 8 h a FF disminuyó la producción de leche, LCG, proteína y caseína total respecto a T0, y tendió a disminuir la producción de grasa. La producción de lactosa tendió a ser menor en T8 respecto a T4. Los tratamientos no afectaron el porcentaje de grasa, proteína, caseína total y lactosa, ni la relación caseína total / proteína o el contenido de N ureico. La secreción de ENL fue 7% mayor en T0 y T4 respecto a T8, pero no hubo efecto de los tratamientos sobre la eficiencia bruta de uso de la MS o la energía para producción de leche. El BE tendió a ser mayor en T0 y T4 respecto a T8.

Cuadro V. Producción y composición de leche

Item	Tratamiento ¹			EEM ²	Valor de <i>P</i>
	T0	T4	T8		
Leche, kg/d	34,4 ^a	34,9 ^a	32,7 ^b	1,50	0,027
LCG ³ , kg/d	37,6 ^a	37,3 ^a	35,1 ^b	1,17	0,012
Grasa, kg/d	1,40 ^x	1,37 ^{xy}	1,29 ^y	0,048	0,068
Grasa, %	4,10	3,95	3,99	0,224	0,604
Proteína, kg/d	1,13 ^a	1,16 ^a	1,06 ^b	0,039	0,022
Proteína, %	3,32	3,35	3,25	0,125	0,118
Caseína total, kg/d	0,86 ^a	0,88 ^a	0,80 ^b	0,032	0,026
Caseína total, %	2,51	2,54	2,46	0,112	0,195
Caseína total: proteína	0,76	0,76	0,76	0,005	0,827
Lactosa, kg/d	1,70 ^{xy}	1,72 ^x	1,62 ^y	0,079	0,058
Lactosa, %	4,95	4,93	4,95	0,057	0,674
N ureico, mg/100 mL	21,2	19,8	18,9	0,97	0,140
ENL ⁴ en leche, Mcal/d	25,9a	25,9a	24,2b	0,53	0,005
Balance de ENL, Mcal/d	4,0 ^x	4,2 ^x	2,0 ^y	0,87	0,098
kg LCG/kg MS ⁵ ingerida	1,56	1,46	1,57	0,072	0,372
ENL en leche/ENL ingerida	0,68	0,64	0,69	0,028	0,414

^{a, b}Dentro de una fila, medias con distintas letras difieren ($P \leq 0,05$).

^{x, y}Dentro de una fila, medias con distintas letras difieren ($0,05 < P \leq 0,10$).

¹T0 = 24 h de acceso a ración totalmente mezclada; T4 = 4 h de acceso a forraje fresco y 20 h de acceso a ración totalmente mezclada; T8: 8 h de acceso a forraje fresco y 16 h de acceso a ración totalmente mezclada.

²Error estándar de la media.

³Leche corregida por grasa al 3,5%

⁴Energía neta para lactancia

⁵Materia seca

En el cuadro VI se presentan los resultados de perfil de ácidos grasos en leche. La grasa láctea de las vacas T8 tuvo un menor contenido de 6:0 y 8:0, y tendió a tener un menor contenido de 4:0 y 10:0 que T0, mientras que el contenido de estos ácidos grasos en las vacas T4 no difirió respecto a los otros tratamientos. La grasa láctea de las vacas T8 también tuvo un mayor contenido de 16:1, ácido oleico, vaccénico y ruménico, y tendió a tener un mayor contenido de ácido linolénico que T0. El contenido de ácidos grasos sintetizados *de novo* tendió a ser menor, mientras que el contenido de ácidos grasos preformados tendió a ser mayor en T8 respecto a T0; los tratamientos no afectaron el contenido de ácidos grasos de origen mixto. El contenido

de ácidos grasos de cadena corta, la relación ácidos grasos saturados/insaturados, y la relación ácidos grasos n6/n3 fue menor, mientras que el contenido de ácidos grasos monoinsaturados fue mayor en T8 respecto a T0; el contenido de ácidos grasos poliinsaturados no fue afectado por los tratamientos. La relación producto/sustrato para 16:1/16:0 y ácido ruménico/ácido vaccénico, y el índice Δ^9 -desaturasa tendió a ser mayor en T8 que T0. El índice de aterogenicidad fue menor en T8 respecto a T0.

Cuadro VI. Perfil de ácidos grasos (AG) en leche

Item	Tratamiento ¹			EEM ²	Valor de <i>P</i>
	T0	T4	T8		
Contenido de AG (g / 100 g del total de AG)					
AG seleccionados ³					
4:0	1,95 ^x	1,66 ^{xy}	1,48 ^y	0,130	0,080
6:0	2,03 ^a	1,76 ^{ab}	1,56 ^b	0,112	0,029
8:0	1,66 ^a	1,50 ^{ab}	1,32 ^b	0,089	0,022
10:0	4,14 ^x	3,91 ^{xy}	3,42 ^y	0,245	0,056
10:1 <i>trans</i> -4	0,43	0,41	0,36	0,033	0,119
11:0	0,07	0,08	0,06	0,012	0,175
12:0	4,95	4,91	4,38	0,304	0,120
13:0	0,12	0,12	0,11	0,013	0,198
14:0	13,60	13,58	12,83	0,403	0,221
14:1 <i>cis</i> -9	1,45	1,47	1,43	0,121	0,870
15:0	1,20	1,24	1,25	0,065	0,666
16:0	32,53	32,18	31,74	1,452	0,653
16:1 <i>cis</i> -9	1,81 ^a	1,90 ^{ab}	2,07 ^b	0,129	0,047
17:0	0,44	0,48	0,52	0,037	0,271
17:1 <i>cis</i> -9	0,11	0,13	0,16	0,019	0,120
18:0	9,39	9,40	9,96	0,960	0,569
18:1 <i>cis</i> -9	19,00 ^a	19,51 ^a	21,14 ^b	0,595	0,031
18:1 <i>trans</i> -9	0,30	0,35	0,35	0,028	0,330
18:1 <i>trans</i> -11	1,24 ^a	1,52 ^{ab}	1,69 ^b	0,145	0,019
18:2 <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12	2,63	2,68	2,64	0,154	0,881
18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11	0,49 ^a	0,65 ^{ab}	0,77 ^b	0,047	0,003
18:3 <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15	0,34 ^x	0,41 ^{xy}	0,49 ^y	0,048	0,062
20:0	0,07	0,08	0,08	0,013	0,682
20:1 <i>cis</i> -11	0,07	0,07	0,08	0,008	0,309
Origen de los AG					
<i>de novo</i> (4:0-15:0)	31,59 ^x	30,63 ^{xy}	28,20 ^y	1,214	0,097
Origen mixto (16:0 + 16:1)	34,34	34,08	33,81	1,452	0,807
Preformados (> 17:0)	34,07 ^x	35,29 ^{xy}	37,88 ^y	1,877	0,065
Nivel de saturación					
Saturados	72,16 ^a	70,90 ^{ab}	68,71 ^b	0,734	0,020
Monoinsaturados	24,39 ^a	25,36 ^{ab}	27,29 ^b	0,659	0,025
Poliinsaturados	3,46	3,74	3,90	0,190	0,133
Saturados: insaturados	2,61 ^a	2,44 ^{ab}	2,21 ^b	0,086	0,023
n-6 : n-3	8,03 ^a	6,77 ^{ab}	5,64 ^b	0,735	0,035
Relación Δ^9 – desaturasa					
14:1 / 14:0	0,106	0,108	0,111	0,0077	0,655
16:1 / 16:0	0,056 ^x	0,059 ^{xy}	0,066 ^y	0,0036	0,069

18:1 / 18:0	2,219	2,309	2,343	0,1363	0,383
18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 / 18:1 <i>trans</i> -11	0,400 ^a	0,431 ^b	0,453 ^b	0,0226	0,002
Índice Δ^9 – desaturasa ⁴	0,29 ^a	0,29 ^a	0,31 ^b	0,006	0,015
Índice de aterogenicidad ⁵	3,33 ^a	3,15 ^{ab}	2,81 ^b	0,147	0,043

^{a, b}Dentro de una fila, medias con distintas letras difieren ($P \leq 0,05$).

^{x, y}Dentro de una fila, medias con distintas letras difieren ($0,05 < P \leq 0,10$).

¹T0 = 24 h de acceso a ración totalmente mezclada; T4 = 4 h de acceso a forraje fresco y 20 h de acceso a ración totalmente mezclada; T8: 8 h de acceso a forraje fresco y 16 h de acceso a ración totalmente mezclada.

²Error estándar de la media.

³18:1 *cis*-9 = ácido oleico; 18:1 *trans*-11 = ácido vaccénico; 18:2 *cis*-9, *trans*-11 = ácido ruménico; 18:3 *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15

⁴Calculado como: (14:1 *cis*-9 + 16:1 *cis*-9 + 18:1 *cis*-9 + 18:2 *cis*-9, *trans*-11)/(14:0 + 16:0 + 18:0 + 18:1 *trans*-11 + 14:1 *cis*-9 + 16:1 *cis*-9 + 18:1 *cis*-9 + 18:2 *cis*-9, *trans*-11).

⁵Calculado como: (12:0 + 4 x 14:0 + 16:0)/(AG monoinsaturados + AG poliinsaturados).

La digestibilidad de la MS o los nutrientes no fue afectada por los tratamientos (Cuadro VII). La tasa de pasaje a través del retículo-rumen (k_1) o ciego-colon (k_2), y los tiempos medios de retención en estos órganos, no fueron afectados por los tratamientos, pero el TMRT fue mayor en T8 respecto a T0.

Cuadro VII. Digestibilidad de nutrientes, y tasa de pasaje

Cuadro V.H. Digestibilidad de nutrientes, y tasa de pasaje					
Item	Tratamiento ¹			EEM ²	Valor de P
	T0	T4	T8		
Digestibilidad ³					
MS	58,2	57,4	64,9	5,57	0,266
MO	63,4	62,1	67,6	4,46	0,423
Nitrógeno	55,1	56,7	62,7	8,45	0,107
FDN	53,6	54,3	59,6	6,30	0,560
Tasa de pasaje ⁷					
k ₁ , h ⁻¹	0,063	0,061	0,043	0,0081	0,189
k ₂ , h ⁻¹	0,261	0,159	0,184	0,0386	0,218
TMRR, h	17,3	16,6	24,0	2,91	0,126
TMRC, h	4,0	6,7	6,1	1,07	0,166
TT, h	10,1 ^b	12,1 ^a	9,1 ^b	1,74	0,016
TMRT, h	31,4 ^b	35,4 ^{ab}	39,1 ^a	3,66	0,048

^{a-c}Dentro de una fila, medias con distintas letras difieren ($P \leq 0,05$).

^{x, y}Dentro de una fila, medias con distintas letras difieren ($0,05 < P \leq 0,10$).

¹T0 = 24 h de acceso a ración totalmente mezclada; T4 = 4 h de acceso a forraje fresco y 20 h de acceso a ración totalmente mezclada; T8: 8 h de acceso a forraje fresco y 16 h de acceso a ración totalmente mezclada.

²Error estándar de la media.

³MS = materia seca; MO = Materia orgánica; FDN = Fibra detergente neutro.

⁴ k_1 = tasa de pasaje desde el retículo-rumen; k_2 = tasa de pasaje desde el ciego-colon; TMRR = Tiempo medio de retención en retículo-rumen; TMRC = Tiempo medio de retención en ciego-colon; TT = Tiempo de tránsito; TMRT = Tiempo medio de retención total.

Los resultados de fermentación ruminal se presentan en el cuadro VIII y en la figura 3. El pH ruminal promedio fue menor en T4 respecto a T8, pero T0 no difirió de ambos tratamientos. La concentración total de AGV fue mayor en T0 y T4 respecto a T8; sin embargo, no hubo efecto de los tratamientos sobre las proporciones de ácido

acético y propiónico en rumen, aunque la proporción de ácido butírico fue mayor en T4 y T8 respecto a T0. Para ninguna de las variables de concentración de AGV se detectó una interacción entre el tratamiento y la hora de medición, pero todas aumentaron o tendieron a aumentar a lo largo del período de medición. Las concentraciones promedio de AGV total permanecieron constantes entre las horas 0 y 6, y luego aumentaron desde 107,4 hasta 133,6 mM a la hora 10. Las concentraciones de ácido acético aumentaron desde 62,2 a 74,2 mM entre las horas 0 y 8 y luego permanecieron constantes, mientras que las concentraciones de ácido propiónico aumentaron desde 23,7 a 32,3 mM entre las horas 0 y 10, y las concentraciones de ácido butírico aumentaron desde 15,1 a 23,2 mM entre las horas 0 y 10. Para las concentraciones de N-NH₃ ruminal se detectó una interacción entre el tratamiento y la hora de medición. Entre las horas 1 y 8, las concentraciones de N-NH₃ fueron menores en T8 respecto a los demás tratamientos, y entre las horas 10 y 14 fueron o tendieron a ser mayores en T8 respecto a T4 (Figura 3).

Cuadro VIII. Fermentación en rumen

Cuadro VIII. Fermentación en tanque							
Item	Tratamiento ¹			EEM ²	Valor de <i>P</i>		
	T0	T4	T8		Tratamiento	Hora	Tratamiento x hora
pH							
Media	6,47 ^{ab}	6,41 ^b	6,53 ^a	0,105	0,014	<0,001	0,293
Mínimo	6,08	5,92	6,16	0,100	0,167	-	-
Máximo	6,85	6,81	6,86	0,079	0,802	-	-
Rango	0,77	0,89	0,70	0,073	0,230	-	-
AGV ³ , mM							
C2	73,8 ^a	74,5 ^a	64,9 ^b	3,30	0,023	0,097	0,712
C3	26,5 ^a	27,8 ^a	23,0 ^b	1,67	0,033	<0,001	0,326
C4	17,7 ^b	21,0 ^a	17,6 ^b	1,34	0,021	<0,001	0,547
Total	117,9 ^a	123,2 ^a	105,6 ^b	5,82	0,015	0,001	0,513
AGV, mol/100 mol							
C2	63,0	60,7	61,9	0,89	0,147	<0,001	0,493
C3	22,6	22,7	21,9	0,78	0,716	<0,001	0,809
C4	14,3 ^b	16,7 ^a	16,2 ^a	0,64	0,021	0,017	0,648
C2:C3	2,92	2,80	3,00	0,160	0,620	<0,001	0,854
(C2+C4):C3	3,57	3,55	3,79	0,191	0,575	<0,001	0,884
N-NH ₃ ⁴ , mg/100 mL							
Media	18,3 ^a	17,1 ^b	17,0 ^b	1,12	0,026	<0,001	<0,001
Mínimo	10,7	10,9	10,9	1,13	0,940	-	-
Máximo	28,7	26,6	26,2	2,92	0,427	-	-
Rango	17,9	15,6	15,3	3,28	0,356	-	-

^{a, b} Dentro de una fila, medias con distintas letras difieren ($P \leq 0,05$).

¹T0 = 24 h de acceso a ración totalmente mezclada; T4 = 4 h de acceso a forraje fresco y 20 h de acceso a ración totalmente mezclada; T8: 8 h de acceso a forraje fresco y 16 h de acceso a ración totalmente mezclada.

²Error estándar de la media.

³Ácidos grasos volátiles; C2 = Ácido acético; C3 = Ácido propiónico; C4 = Ácido butírico.

⁴Nitrógeno amoniacal

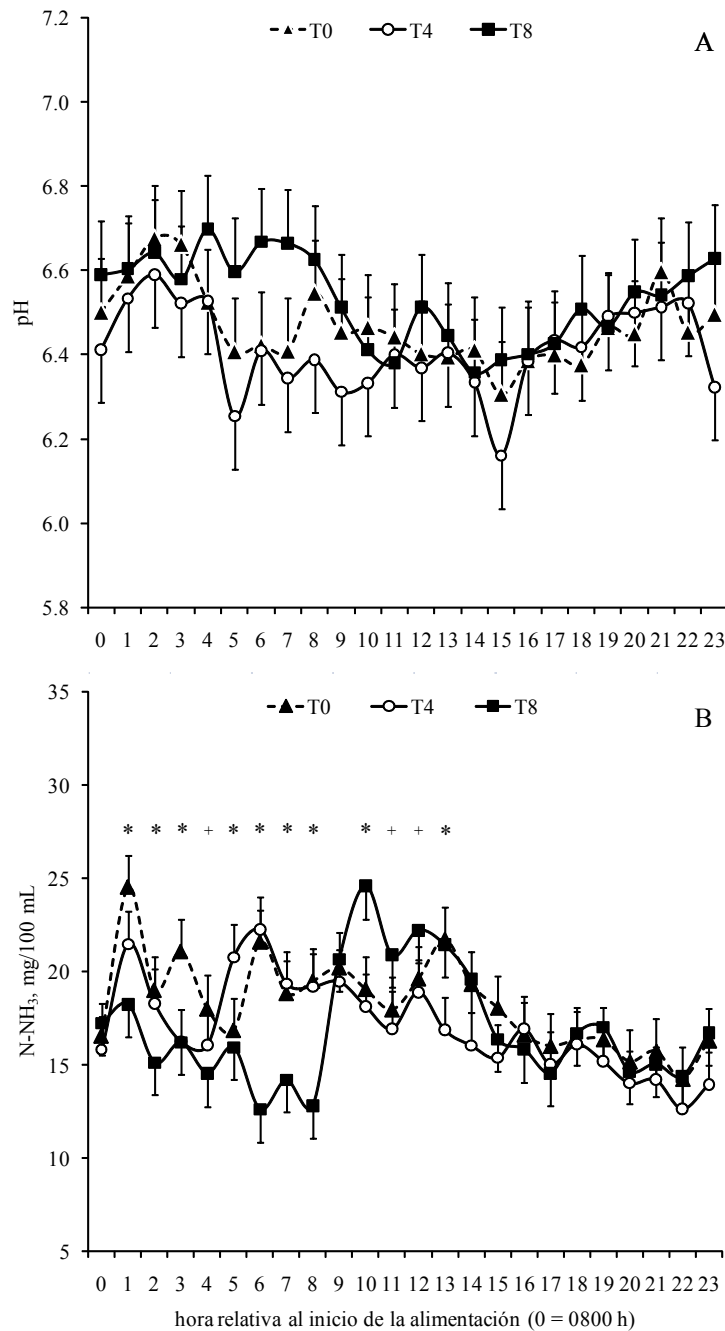


Figura 3. pH (A) y concentraciones de N amoniacal (N-NH₃) (B) en rumen. Los asteriscos o cruces en cada hora indican la existencia de al menos una diferencia entre tratamientos ($P \leq 0,05$, o $0,05 < P \leq 0,10$, respectivamente). T0 = 24 h de acceso a ración totalmente mezclada; T4 = 4 h de acceso a forraje fresco y 20 h de acceso a ración totalmente mezclada; T8: 8 h de acceso a forraje fresco y 16 h de acceso a ración totalmente mezclada. El forraje fresco fue ofrecido a partir de las 0800 h (inicio de la primera sesión de alimentación).

En el cuadro IX se presentan los resultados de flujo de N microbiano a duodeno, y de utilización del N. Las concentraciones urinarias de alantoína y ácido úrico, la excreción urinaria de derivados de purinas, el flujo a intestino de N microbiano, y la eficiencia bruta de uso del N ingerido para la síntesis de N microbiano, no fueron afectadas por los tratamientos. Los tratamientos tampoco afectaron la eficiencia bruta de uso del N para producción de leche. La excreción urinaria de N no fue afectada por los tratamientos, pero la excreción de N fecal fue mayor en T0 y T4 respecto a T8.

Cuadro IX. Flujo de nitrógeno (N) microbiano a duodeno y utilización del N

Item	Tratamiento ¹			EEM ²	Valor de P
	T0	T4	T8		
Creatinina, mM	5,2	5,6	5,7	0,60	0,599
Alantoína, mM	20,5	19,6	18,9	1,72	0,451
Ácido úrico, mM	4,4	4,1	4,5	3,78	0,282
DP ³ , mM	24,9	23,8	23,4	2,02	0,531
DP:creatinina	4,85	4,41	4,40	0,598	0,512
DP, mmol/d	538,8	487,5	477,9	56,38	0,495
Flujo de N microbiano, g/d	367,5	329,9	322,6	41,84	0,495
Eficiencia de uso de N para síntesis de N microbiano ⁴ , %	54,6	47,5	52,6	8,23	0,253
Utilización de N					
Consumo de N, g/d	671 ^a	694 ^a	611 ^b	38,9	0,046
Excreción de N en orina					
g/d	164	161	172	17,1	0,700
% del N consumido	24,6	23,1	28,2	1,91	0,123
Excreción de N en heces					
g/d	303 ^a	324 ^a	228 ^b	37,6	0,031
% del N consumido	43,8	46,4	39,8	8,45	0,362
Excreción de N en efluentes					
g/d	467 ^a	486 ^a	400 ^b	79,2	0,022
% del N consumido	68,3	69,6	69,9	9,29	0,855
g/g N en leche	2,7	2,7	2,4	0,36	0,323
Excreción de N en leche					
g/d	173 ^a	181 ^a	166 ^b	6,1	0,022
% del N consumido	26,0	26,0	27,2	0,84	0,220

^{a, b} Dentro de una fila, medias con distintas letras difieren ($P \leq 0,05$).

¹T0 = 24 h de acceso a ración totalmente mezclada; T4 = 4 h de acceso a forraje fresco y 20 h de acceso a ración totalmente mezclada; T8: 8 h de acceso a forraje fresco y 16 h de acceso a ración totalmente mezclada.

²Error estándar de la media.

³Derivados de purinas.

⁴Flujo de N microbiano a duodeno/consumo total de N.

Los resultados de metabolitos y hormonas en sangre se presentan en el cuadro X y la figura 4. Las concentraciones sanguíneas de glucosa e insulina fueron mayores en T0 que en T8, pero no hubo efecto de los tratamientos en las concentraciones de glucagón, o la relación insulina/glucagón. Para insulina se detectó un efecto de la hora de medición, donde las concentraciones aumentaron desde 22,0 a 30,9 μ IU/mL entre las horas 0 y 10 (Figura 4). Para la concentración sanguínea de urea se detectó

una interacción entre tratamiento y hora de medición; la concentración en T8 fue o tendió a ser menor respecto a T0 a las horas 2 y 4, y fue mayor respecto a T4 a la hora 8.

Cuadro X. Metabolitos y hormonas en sangre

Item	Tratamiento ¹			EEM ₂	Valor de P		
	T0	T4	T8		Tratamiento	Hora	Tratamiento x hora
Glucosa, mM	4,34 ^a	4,24 ^a _b	4,12 ^b	0,168	0,017	0,195	0,491
Urea, mM	6,72	6,57	6,23	0,329	0,172	0,293	0,014
Insulina, μ IU/mL	28,2 ^a	24,5 ^a _b	23,2 ^b	2,25	0,023	<0,00 ₁	0,832
Glucagón, pg/mL	105,9	106,4	104,3	13,34	0,944	0,869	0,497
Insulina:glucagón	0,31	0,26	0,24	0,058	0,112	0,467	0,918

^{a, b} Dentro de una fila, medias con distintas letras difieren ($P \leq 0,05$).

¹T0 = 24 h de acceso a ración totalmente mezclada; T4 = 4 h de acceso a forraje fresco y 20 h de acceso a ración totalmente mezclada; T8: 8 h de acceso a forraje fresco y 16 h de acceso a ración totalmente mezclada.

²Error estándar de la media.

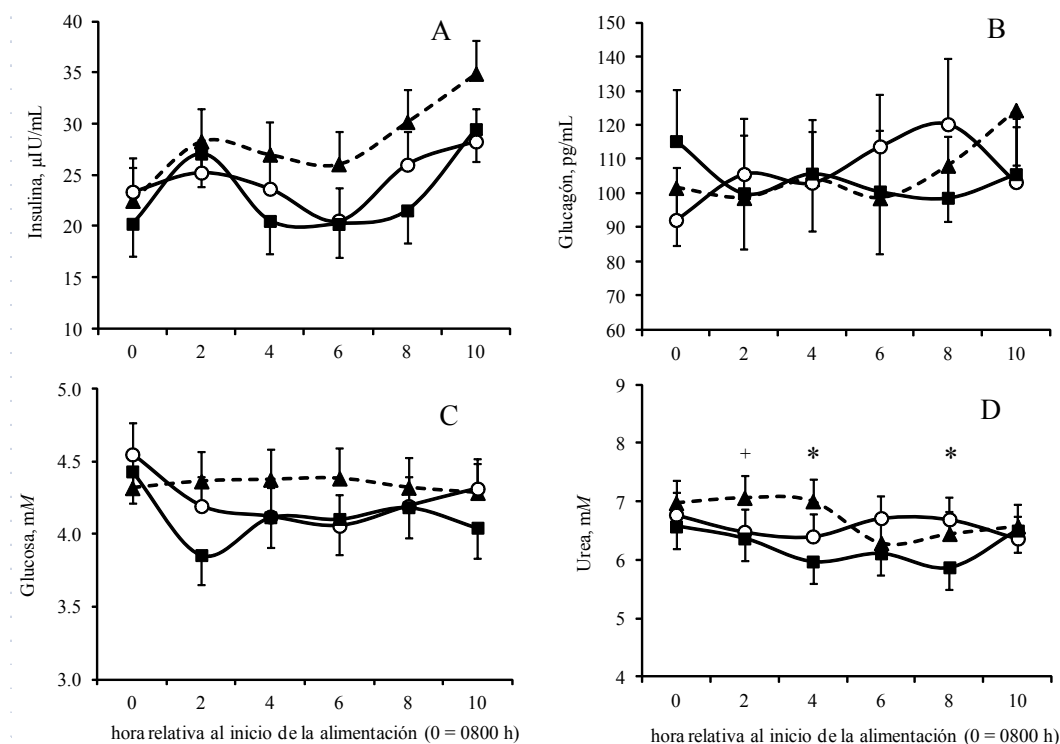


Figura 4. Concentraciones sanguíneas de insulina (A), glucagón (B), glucosa (C) y urea (D). Los asteriscos o cruces en cada hora indican la existencia de al menos una diferencia entre tratamientos ($P \leq 0,05$, o $0,05 < P \leq 0,10$, respectivamente). T0 = 24

h de acceso a ración totalmente mezclada; T4 = 4 h de acceso a forraje fresco y 20 h de acceso a ración totalmente mezclada; T8: 8 h de acceso a forraje fresco y 16 h de acceso a ración totalmente mezclada. El forraje fresco fue ofrecido a partir de las 0800 h (inicio de la primera sesión de alimentación).

DISCUSIÓN

El consumo total de MS no difirió entre T0 y T4, pero las vacas consumiendo únicamente RTM exhibieron un porcentaje de tiempo dedicado a comer y una TCMS más estable a lo largo del período de observación. Las bajas TCMS logradas por las vacas T4 y T8 cuando tuvieron acceso a FF sugieren que estos animales habrían tenido enfrentado algún tipo de dificultad para alcanzar una alta TCMS cuando se les ofreció este alimento. En el caso de las vacas T8, esta baja TCMS al consumir FF fue compensada con más horas consumiendo a una alta TCMS una vez que tuvieron acceso a la RTM. Para las vacas T8, el consumo de MS durante las primeras 8 h luego del inicio de la primera sesión de alimentación, expresado como porcentaje del consumo diario total de MS, fue de solo 9,7%, y resultó en niveles de inclusión de FF en la MS total consumida llamativamente bajos (< 17%). Una explicación para este hallazgo puede estar relacionada con el bajo contenido de MS del FF. Cabrera Estrada et al. (2004) observaron reducciones en el consumo de FF por vacas lecheras debido al alto contenido de agua interna, lo que estuvo asociado a una disminución en la TCMS; es posible que otros factores estén involucrados en explicar este fenómeno, como cambios en el llenado ruminal por la alta ingesta de agua, o una más difícil manipulación de las partículas de alimento. Si bien las vacas T4 también habrían experimentado esta dificultad, tuvieron 4 h más de acceso a la RTM que las vacas T8. Es probable que, debido al mayor contenido de MS de la RTM, los animales pudieran alcanzar una alta TCMS al consumir este alimento, lo que habría permitido a las vacas T4 mantener un consumo de nutrientes similar al de T0. Adicionalmente, luego de las 2100 h las luces en el establo fueron apagadas, lo que significa que la mayor parte del tiempo que las vacas T8 accedieron a la RTM ocurrió cuando hay una reducción natural en la actividad de alimentación debida a la ausencia de luz (DeVries et al., 2003).

Morales et al. (2010) alimentaron a vacas lecheras con una RTM *ad libitum* en combinación con 0, 6 o 12 h de acceso a una pastura de alta calidad y no reportaron disminuciones en el consumo total de MS, aún cuando la pastura contribuyó con hasta 37% de la MS total de la dieta. Por otra parte, Vibart et al. (2008) reportaron una disminución lineal en el consumo total de MS a mayor nivel de inclusión de una pastura de alta calidad (hasta un nivel equivalente a 35% de la MS total de la dieta), aunque el consumo de PC no difirió entre tratamientos. Sin embargo, cuando los mismos autores usaron la misma pastura pero en un estado de madurez más avanzado y con un menor contenido de PC que la RTM, el consumo total de MS disminuyó a medida que la proporción de pastura en la dieta aumentó. Este resultado resalta la influencia de la calidad del FF usado en la respuesta de las vacas lecheras, sugiriendo que la alta calidad del forraje usado en nuestro experimento habría permitido, al menos en T4, mantener un consumo de nutrientes similar al de T0.

Estudios previos han reportado que la inclusión de FF en la dieta de vacas alimentadas con RTM causa una reducción en el rendimiento de leche y sólidos, que se explica principalmente por una reducción en el consumo de MS (Kolver & Muller, 1998; Bargo et al., 2002a). Sin embargo, en este trabajo solo se observó una disminución en el rendimiento de LCG, proteína y caseína total cuando las vacas tuvieron acceso al FF por más de 4 h al día. Trabajos previos que no detectaron diferencias en producción de leche o LCG entre vacas alimentadas con RTM con o

sin acceso a un FF tampoco detectaron diferencias en el consumo de MS o nutrientes (Chapinal et al., 2010; Morales et al., 2010). Vibart et al. (2008) reportaron una reducción en la producción de leche de vacas solo cuando la inclusión de FF condujo a una reducción en el consumo total de MS, lo que ocurrió al trabajar con un FF de menor calidad que la RTM usada. La falta de efecto de los tratamientos sobre la composición de leche es coincidente con resultados de diversos experimentos (Bargo et al., 2002a; Loores et al., 2003; Chapinal et al., 2011), y como resultado, los rendimientos de los distintos sólidos lácteos siguieron la misma tendencia que la producción de leche, reflejando la diferente ingesta de precursores de componentes de la leche. Si bien eran esperables mayores concentraciones de N ureico en leche en T0 y T4 respecto a T0, debido a la mayor ingesta de PC en aquellos tratamientos, no hubo diferencias entre tratamientos para esta variable. Si bien no fue medida en este trabajo, es posible que la alta degradabilidad de la PC de los FF (Rajala-Schultz & Saville, 2003) haya conducido a un consumo de PC degradable en rumen similar entre tratamientos, a pesar del menor consumo de PC en T8; como el nivel de ingesta de proteína degradable en rumen afecta positivamente las concentraciones de N ureico en leche (Reynal & Broderick, 2005; Agle et al., 2010), esto podría explicar la falta de efecto de los tratamientos sobre esta variable.

Los efectos de incluir FF en la dieta de vacas alimentadas con una RTM sobre la eficiencia de uso del alimento son inconsistentes, con experimentos que han reportado tanto aumentos como disminuciones a medida que aumenta la proporción de FF en la dieta (Wales et al., 2013). Es posible que, debido a que las vacas en el presente experimento tenían 100 días en lactancia al inicio del mismo, parte de la energía consumida no haya sido utilizada para producción de leche sino que haya sido dirigida hacia la recuperación de reservas corporales (Yan et al., 2006), lo que habría contribuido a explicar la falta de respuesta de los tratamientos sobre la eficiencia bruta de uso de la energía para producción de leche. También debe tenerse presente que en este experimento las vacas no tuvieron gastos de energía asociados a la caminata o a la búsqueda y cosecha de forraje como ocurre en un sistema pastoril, y por lo tanto habrían sido capaces de destinar más energía a sintetizar leche que si hubieran pastoreado. De todos modos, este es un resultado promisorio porque sugiere que es posible incluir un alimento de bajo costo como el FF (si es de alta calidad) en la dieta de vacas lecheras de alta producción y alcanzar una eficiencia de uso del alimento similar a la de vacas alimentadas únicamente con RTM. Las similares eficiencias brutas de uso de la MS o la energía para producción de leche observadas sugieren que las diferencias en producción de leche habrían sido causadas mayoritariamente por diferencias en el consumo de nutrientes, más que debidas a cambios en la digestión o utilización de los nutrientes, como ya fuera planteado por Kolver & Muller (1998). El resultado también resalta la calidad del FF usado en este experimento, que habría permitido alcanzar una digestión de nutrientes similar a la de T0, un resultado también reportado por Bargo et al. (2002a).

El perfil de grasa láctea en T8 tuvo, en general, características consideradas como más saludables desde el punto de vista de la salud humana respecto a T0, incluyendo un mayor contenido de ácido vaccénico y ruménico; este último tiene efectos beneficiosos potenciales en reducir la incidencia de cáncer, prevenir la arterioesclerosis y la hipertensión, y mejorar la función inmune (Bhattacharya et al. 2006). Estos resultados están de acuerdo con los reportados por Vibart et al. (2008) y

Morales et al. (2010), quienes observaron que incrementar el nivel de inclusión de FF en la dieta de vacas lecheras alimentadas con una RTM aumentó el contenido de estos 2 ácidos grasos en la leche. Es destacable que un nivel de inclusión de FF tan bajo como 16% (base seca) en la dieta de vacas alimentadas con RTM puede tener efectos positivos en términos de aumentar el contenido de ácidos grasos beneficiosos. Estos cambios en el perfil de grasa láctea pueden ser explicados por la alta proporción de ácido linolénico en los FF (Glasser et al., 2013). La ingestión de ácido linolénico aumenta la síntesis de ácido vaccénico en rumen, que a su vez es convertido en ácido ruménico en la glándula mamaria por acción de la enzima Δ^9 -desaturasa (Bauman et al., 2008). Parte del ácido linolénico no es biohidrogenado en el rumen sino que se absorbe intacto a nivel intestinal y es secretado en la leche, lo que explicaría la tendencia a que haya un mayor contenido de ácido linolénico en T8 respecto a T0. La mayor relación producto/sustrato para ácido ruménico/ácido vaccénico en T8 también podría explicar parcialmente el mayor contenido de ácido ruménico en este tratamiento. Lock & Garnsworthy (2003) también reportaron un aumento en la actividad de la enzima Δ^9 -desaturasa a mayor nivel de pastura en la dieta de vacas lecheras; sin embargo, las razones para este hallazgo no están claras. La grasa láctea en T8 presentó un menor índice de aterogenicidad que en T0, lo que se explicaría por el mayor contenido de ácidos grasos monoinsaturados, particularmente ácido oleico. A su vez, la mayor captación de ácido linolénico por la glándula mamaria explicaría la menor relación ácidos grasos saturados/insaturados en T8 respecto a T0, así como el menor contenido de ácidos grasos sintetizados *de novo*. La menor relación n6/n3 en la grasa láctea observada en T8 respecto a T0 podría tener algunos beneficios relacionados con la salud humana (Ruxton et al., 2005).

El mayor TMRT observada en T8 es consistente con el menor consumo observado en estos animales. Adicionalmente, el mayor TMRT en podría estar asociado a que el FF fue ofrecido a los animales sin cortar. En este sentido, Boudon et al. (2006) reportaron que ofrecer FF de esta manera reduce la tasa de disminución de las partículas, lo que podría restringir la tasa de salida de las mismas desde el rumen. Esto podría haber resultado en un mayor TMRR, que si bien no fue estadísticamente diferente, fue numéricamente mayor en T8 respecto a T0. Debido a que la digestión es un proceso dependiente del tiempo de permanencia del alimento, se habría esperado que un mayor TMRT hubiera resultado en una mayor digestión de nutrientes en el tracto digestivo, particularmente de la fibra (Allen & Mertens, 1988). Sin embargo, esto no se observó en el presente experimento. Bargo et al. (2002a) y Soder et al. (2013), usando métodos *in vivo* o *in vitro*, respectivamente, tampoco reportaron diferencias en la digestibilidad de la MS o MO entre una dieta 100% RTM, una dieta 100% FF, o una combinación de RTM y FF, pero en ambos experimentos se detectó una menor digestibilidad de la FDN a mayor proporción de RTM en la dieta. En rumiantes, la digestión de la FDN ocurre principalmente en el rumen, comprendiendo un 95% de la digestión total de FDN (Huhtanen et al., 2010), por lo que cualquier reducción de la digestión en dicho órgano podría comprometer la digestión en todo el tracto digestivo. Si bien condiciones ruminales subóptimas para las bacterias celulolíticas pueden reducir la tasa y extensión de la digestión de la fibra en el rumen, en este experimento los valores de pH estuvieron siempre por encima de los mínimos que optimizan el crecimiento de la microbiota ruminal (Hoover, 1986), y por lo tanto no parecen haber limitado la digestión de esta fracción en ningún tratamiento. Esto concuerda con la distribución de partículas de la RTM,

que estuvo dentro de los límites recomendados (Heinrichs, 2013), así como con el uso de distintos aditivos como ingredientes de la RTM para prevenir episodios de acidosis. También se hace notar que el ensilaje de maíz usado en este trabajo fue cortado en un estado vegetativo, y si bien no fue medido, probablemente tuvo una mayor digestibilidad de la FDN que un ensilaje de maíz normal, por lo que habría sido menos sensible a variaciones en la tasa de pasaje, particularmente en T0.

El menor pH promedio en T4 respecto a T8 probablemente se debió al mayor consumo de MO en T4, que habría incrementado el aporte de energía fermentescible a nivel ruminal, y habría llevado a una mayor producción de AGV total. Soder et al. (2013), usando un método *in vitro*, también reportaron mayores concentraciones totales de AGV a nivel ruminal usando dietas 100% RTM respecto a 100% FF, lo que los autores atribuyeron al mayor contenido de CNF de la RTM. Sin embargo, ni Bargo et al. (2002b) ni Santana et al. (2016) observaron efectos del tipo de dieta (RTM o RTM más FF) sobre la concentración total o las proporciones de AGV, en vacas lecheras o vaquillonas Angus x Hereford, respectivamente. La mayor proporción de ácido butírico observada en T4 y T8 respecto a T0 coincide con lo reportado por Vibart et al. (2010) y Salado et al. (2012b). Las concentraciones promedio de N-NH₃ en rumen se encontraron por encima de los valores que optimizarían el crecimiento microbiano (Clark et al., 1992). El patrón de variación de las concentraciones de N-NH₃ observado podría reflejar el distinto comportamiento ingestivo de los animales durante las primeras 8 h luego del inicio de la primera sesión de alimentación, donde las vacas T8 tuvieron un muy bajo consumo de FF, y probablemente de N, respecto a los otros tratamientos. La situación se habría revertido una vez que estos animales tuvieron acceso a la RTM luego de la hora 8, posiblemente por la alta TCMS que desarrollaron las vacas T8 a partir de este momento.

La falta de efecto de los tratamientos sobre las distintas variables relacionadas con el flujo de N microbiano a duodeno coincide con lo reportado por otros autores. Sin embargo, los resultados obtenidos están en contradicción con el mayor consumo de EN_L y N observado en T0 y T4 comparado con T8, lo que de acuerdo con Clark et al. (1992), debería haber provisto de más sustratos para la síntesis de N microbiano en rumen, y por lo tanto en un mayor flujo de N microbiano a duodeno en esos tratamientos. Además, la oferta de una RTM debería conducir a una mayor sincronización en la oferta ruminal de fuentes de energía y N respecto a incluir FF en la dieta, debido a la mayor relación proteína/energía de este último alimento (117 vs 104 g PC/Mcal EN_L). Usando la relación alantoína/creatinina en orina, Bargo et al. (2002a) tampoco detectaron diferencias en flujo de N microbiano entre vacas lecheras consumiendo RTM o RTM con acceso a FF, pero Santana et al. (2016) reportaron que alimentar vaquillonas únicamente con FF respecto a RTM redujo el flujo de N microbiano en 35%. En el presente experimento, las vacas T8 consumieron 13% menos CNF y 9% menos N que las vacas T0, mientras que en el experimento de Bargo et al. (2002a) las vacas alimentadas con RTM y FF consumieron 18% menos cantidad de carbohidratos no estructurales y 7% más N que las vacas alimentadas solamente con RTM. Sin embargo, en el estudio de Santana et al. (2016) las vaquillonas alimentadas solo con FF consumieron 64% menos CNF que las alimentadas solo con RTM, sugiriendo que las diferencias entre estudios

estarían relacionadas con las cantidades o proporciones de sustratos energéticos y nitrogenados aportados a los microorganismos del rumen.

La falta de efecto de los tratamientos sobre la eficiencia bruta de uso del N para producción de leche es destacable, porque se ha sostenido que esta variable es inherentemente baja en vacas lecheras alimentadas con FF (Hoekstra et al., 2007) y que es menor que en vacas alimentadas únicamente con RTM (Kolver & Muller, 1998). La mayor excreción de N fecal en T0 y T4 respecto a T8 podría explicarse por el mayor consumo de PC en aquellos tratamientos. Adicionalmente, debido a que la PC metabólica fecal se excreta de forma proporcional al nivel de ingestión del animal (NRC, 2001), el mayor consumo en T0 y T4 comparado con T8 también podría explicar parcialmente las diferencias en la excreción de N fecal entre tratamientos. También es destacable que si bien la excreción de N en heces y orina fue mayor en T0 y T4 respecto a T8, cuando se expresan como porcentaje del N consumido o por gramo de N excretado en leche, no se detectaron diferencias entre tratamientos.

La mayor concentración sanguínea de glucosa en T0 respecto a T8 podría reflejar una mayor tasa de gluconeogénesis hepática como resultado de una mayor producción de ácido propiónico en el rumen, una mayor cantidad de almidón sin digerir que llegue al rumen, o ambas. A su vez, la mayor concentración sanguínea de insulina en T0 respecto a T8 parecería ser una respuesta a la mayor glicemia de aquellos animales, así como también el resultado de una mayor secreción estimulada por algunos AGV como el ácido propiónico (Harmon, 1992). Si bien Zarrin et al. (2015) sugirieron que un incremento en la concentración de insulina reduciría la secreción de glucagón durante una situación de glicemia normal o elevada en vacas lecheras, en este experimento no se observó un efecto de los tratamientos sobre dicha variable. Es posible que la magnitud del cambio en la concentración de insulina entre T0 y T8 no haya sido suficiente como para desatar una respuesta similar a la reportada por Zarrin et al. (2015). Aunque no fue medido todo el día, el patrón de evolución de la urea en sangre coincide con la evolución de la concentración ruminal de N-NH_3 hasta la hora 12 luego del inicio de la primera sesión de alimentación, particularmente en el caso de las vacas T8, y reflejaría los cambios temporales en la ingestión de N como fuera explicado previamente.

CONCLUSIONES GENERALES E IMPLICANCIAS

Es posible incluir FF de alta calidad en la dieta de vacas lecheras alimentadas con una RTM y lograr un consumo de energía y una producción de leche similar a la de vacas alimentadas únicamente con una RTM. Sin embargo, un tiempo de acceso diario a un FF de alta calidad mayor a 4 h redujo el consumo de energía, y la producción de leche y sólidos, pero permitió incrementar las concentraciones de ácido ruménico, vaccénico y linolénico en la grasa láctea. No hubo diferencias entre tratamientos respecto a la digestión de los nutrientes o la eficiencia de uso del alimento.

Debido a que el FF de alta calidad es un alimento que tiene un menor costo por unidad de MS que las RTM, una posible línea de investigación a futuro debería tratar de identificar estrategias de alimentación que aumenten la proporción de FF en la dieta de vacas lecheras que incluya una RTM para alcanzar un alto contenido de ácidos grasos beneficiosos para la salud humana en la leche, sin deprimir el consumo de nutrientes, la producción de leche o la eficiencia de uso del alimento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acosta Y, Karlen H, Villanueva N, Mieres J, La Manna A. (2010). Intensificación: El rol de la alimentación. Serie actividades de difusión N° 610. INIA. Montevideo. pp.55-62.
2. Adams RF, Jones RL, Conway PL. (1984). High-performance liquid chromatography of microbial acid metabolites. *J Chromatogr* 336:125-137.
3. Agle M, Hristov AN, Zaman S, Schneider C, Ndegwa P, Vaddella VK. (2010). The effects of ruminally degraded protein on rumen fermentation and ammonia losses from manure in dairy cows. *J Dairy Sci* 93:1625-1637.
4. Allen MS, Mertens DR. (1988). Evaluating constraints on fiber digestion by rumen microbes. *J Nutr* 118:261-270.
5. Allen MS. (1996). Physical constraints on voluntary intake of forages by ruminants. *J Anim Sci* 74:3063-3075.
6. Allen MS. (2000). Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *J Dairy Sci* 83:1598-1624.
7. Allen MS, Bradford BJ, Oba M. (2009). Board-invited review: The hepatic oxidation theory of the control of feed intake and its application to ruminants. *J Anim Sci* 87:3317-3334.
8. AOAC International. (1990). Official Methods of Analysis. Ed. AOAC International 15^a ed. Arlington.
9. Aschenbach JR, Kristensen NB, Donkin SS, Hammon HM, Penner GB. (2010). Gluconeogenesis in dairy cows: The secret of making sweet milk from sour dough. *Life* 62:869-877.
10. Balcells J, Guada JA, Peiró JM. (1992). Short communication: Simultaneous determination of allantoin and oxypurines in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 515:153-151.
11. Barca J. (2016). Perfil de ácidos grasos en leche de vacas alimentadas en base a dieta totalmente mezclada combinadas o no con diferentes tiempos de pastoreo. Tesis de maestría, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
12. Bargo F, Muller LD, Delahoy JE, Cassidy TW. (2002a). Performance of high producing dairy cows with three different feeding systems combining pasture and total mixed rations. *J Dairy Sci* 85:2948-2963.
13. Bargo F, Muller LD, Varga GA, Delahoy JE, Cassidy TW. (2002b). Ruminant digestion and fermentation of high-producing dairy cows with three different feeding systems combining pasture and total mixed rations. *J Dairy Sci* 85:2964-2973.
14. Bargo F, Muller LD, Kolver ES, Delahoy JE. (2003). Invited review: Production and digestion of supplemented dairy cows on pasture. *J Dairy Sci* 86:1-42.
15. Bargo F, Delahoy JE, Schroeder GF, Baumgard LH, Muller LD. (2006). Supplementing total mixed rations with pasture increase the content of conjugated linoleic acid in milk. *Anim Feed Sci Technol* 131:226-240.
16. Bauman DE, Griinari JM. (2003). Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annu Rev Nutr* 23:203-227.
17. Bauman DE, Perfield II JW, Harvatine KJ, Baumgard LH. (2008). Regulation of fat synthesis by conjugated linoleic acid: Lactation and the ruminant model. *J Nutr* 138:403-409.

18. Bhattacharya A, Banu J, Rahman M, Causey J, Fernandes G. (2006). Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *J Nutr Biochem* 17:789-810.
19. Bines JA, Hart IC. (1982). Metabolic limits to milk production, especially roles of growth hormone and insulin. *J Dairy Sci* 65:1375-1389.
20. Boudon A, Acosta A, Delagarde R, Peyraud JL. (2006). Release of cell contents and comminution of particles of perennial ryegrass herbage during ingestion by dairy cows fed indoors or grazing. *Grass For Sci* 61:205-217.
21. Bramley E, Lean IJ, Fulkerson WJ, Stevenson MA, Rabiee AR, Costa ND. (2008). The definition of acidosis in dairy herds predominantly fed on pasture and concentrates. *J Dairy Sci* 91:308-321.
22. Cabrera Estrada JI, Delagarde R, Faverdin P, Peyraud JL. (2004). Dry matter intake and eating rate of grass by dairy cows is restricted by internal, but not external water. *Anim Feed Sci Technol* 114:59-74.
23. Cabrita ARJ, Dewhurst RJ, Abreu JMF, Fonseca AJM. (2006). Evaluation of the effects of synchronising the availability of N and energy on rumen function and production responses of dairy cows – a review. *Anim Res* 55:1-24.
24. Cajarville C, Mendoza A, Santana A, Repetto JL. (2012). En tiempo de intensificación productiva, ¿cuánto avanzamos en el conocimiento de los nuevos sistemas de alimentación de la vaca lechera? *Veterinaria (Montevideo)* 48:35-39.
25. Calsamiglia S, Blanch M, Ferret A, Moya D. (2012). Is subacute ruminal acidosis a pH related problem? Causes and tools for its control. *Anim Feed Sci Technol* 172: 42-50.
26. Capper JL, Cady RA, Bauman DE. (2009). The environmental impact of dairy production: 1944 compared with 2007. *J Anim Sci* 87:2160-2167.
27. Cavestany D, Blanc JE, Kulcsar M, Uriarte G, Chilibraste P, Meikle A, Febel H, Ferraris A, Krall E. (2005). Studies of the transition cow under a pasture-based milk production system: metabolic profiles. *J Vet Med A* 52:1-7.
28. Chapinal N, Goldhawk C, de Passillé AM, von Keyserlingk MAG, Weary DM, Rushen J. (2010). Overnight access to pasture does not reduce milk production or feed intake in dairy cattle. *Livest Sci* 129:104-110.
29. Chapinal N, Weary DM, Rushen J, de Passillé AM, von Keyserlingk MAG. (2011). Effects of temporal restriction in availability of the total mixed ration on feeding and competitive behavior in lactating dairy cows. *Livest Sci* 137:282-286.
30. Chen XB, Gomes MJ. (1992). Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: An overview of technical details. Ed. Rowett Research Institute, Aberdeen.
31. Chilibraste P, Gibb M, Tamminga S. (2005). Pasture characteristics and animal performance. En: Dijkstra J, Forbes JM, France J. Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism. Ed. CAB International 2ª ed. Wallingford, Cap. 26, pp.681-706.
32. Chilliard Y. (1999). Metabolic adaptations and nutrient partitioning in the lactating animal. En: Martinet J, Houdebine LM, Head HH. Biology of Lactation. Ed. Inserm/INRA. Paris, Cap. 20, pp.503-552.
33. Clark JH, Klusmeyer TH, Cameron MR. (1992). Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. *J Dairy Sci* 75:2304-2323.

34. Colucci PE, Macleod GK, Grovum WL, McMillan I, Barney DJ. (1990). Digesta kinetics in sheep and cattle fed diets with different forage to concentrate ratios at high and low intakes. *J Dairy Sci* 73:2143-2156.
35. Coppock CE, Bath DL, Harris B. (1981). From feeding to feeding systems. *J Dairy Sci* 64: 1230-1249.
36. Crampton EW, Donefer E, Lloyd LE. (1960). A nutritive value index for forages. *J Anim Sci* 19:538-544.
37. Croissant AE, Washburn SP, Dean LL, Drake MA. (2007). Chemical properties and consumer perception of fluid milk from conventional and pasture-based production systems. *J Dairy Sci* 90: 4942-4953.
38. Dall-Orsoletta AC, Almeida JGR, Carvalho PCF, Savian JV, Ribeiro-Filho HMN. (2016). Ryegrass pasture combined with partial total mixed ration reduces enteric methane emissions and maintains the performance of dairy cows during mid to late lactation. *J Dairy Sci* 99:4374-4383.
39. DePeters EJ, Ferguson JD. (1992). Nonprotein nitrogen and protein distribution in the milk of cows. *J Dairy Sci* 75:3192-3209.
40. de Veth MJ, Kolver ES. (2001). Digestion of ryegrass pasture in response to change in pH in continuous culture. *J Dairy Sci* 84:1449-1457.
41. DeVries TJ, von Keyserlingk MAG, Beauchemin KA. (2003). Short communication: Diurnal feeding pattern of lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 86:4079-4082.
42. Dhanoa MS, Siddons RC, France J, Gale DL. (1985). A multicompartamental model to describe marker excretion patterns in ruminant faeces. *Br J Nut* 53:663-671.
43. DIEA. (2014). Anuario estadístico agropecuario 2014. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección de Estadísticas Agropecuarias, Uruguay. Acceso: 11 Mayo, 2015. <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-principal,O,es,0>
44. Dillon P. (2006). Achieving high dry-matter intake from pasture with grazing dairy cows. *En: Elgersma A, Tamminga S. Fresh herbage for dairy cattle*. Ed. Springer. Dordrecht, Cap. 1, pp.1-26.
45. Dillon P, Berry DP, Evans RD, Buckley F, Horan B. (2006). Consequences of genetic selection for increased milk production in European seasonal pasture based systems of milk production. *Livest Sci* 99:141-158.
46. Drackley JK, Overton TR, Douglas GN. (2001). Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. *J Dairy Sci* 84(E Suppl):E100-E112.
47. Durán H. (2004). Cambios tecnológicos e intensificación en los sistemas pastoriles de producción de leche en Uruguay. Serie Actividades de difusión N° 361. INIA. Montevideo. pp.115-121.
48. Dynes RA. (1996). The animal: Options for managing intake. *Aust J Agric Res* 47:277-287.
49. Eastridge ML. (2006). Major advances in applied dairy cattle nutrition. *J Dairy Sci* 89:1311-1323.
50. Elgersma A, Tamminga S, Ellen G. (2006). Modifying milk composition through forage. *Anim Feed Sci Technol* 131:207-225.
51. Elzo MA, Jara A, Barria N. (2004). Genetic parameters and trends in the Chilean multibreed dairy cattle population. *J Dairy Sci* 87:1506-1518.

52. Fahey GC, Berger LL. (1993). Carbohydrate nutrition of ruminants. En: Church DC. The ruminant animal. Digestive physiology and nutrition. Ed. Waveland Press 2^a ed. Prospect heights, Cap. 14, pp.269-297.
53. Fajardo M, Mattiauda DA, Motta G, Genro TC, Meikle A, Carriquiry M, Chilibraste P. (2015). Use of mixed rations with different access time to pastureland on productive responses of early lactation Holstein cows. *Livest Sci* 181:51-57.
54. Feng S, Lock AL, Garnsworthy PC. (2004). Technical note: A rapid lipid separation method for determining fatty acid composition of milk. *J Dairy Sci* 87:3785-3788.
55. Forbes JM. (2007). A personal view of how ruminant animals control their intake and choice of food: minimal total discomfort. *Nutr Res Rev* 20:132-146.
56. Fox PF. (2011). Bovine milk. En: Fuquay JW, Fox PF, McSweeney PLH. Encyclopedia of dairy sciences. Ed. Academic Press. 2^a ed. Oxford. pp: 478-483.
57. Gill M. (1979). The principles and practice of feeding ruminants on complete diets. *Grass For Sci* 34:155-161.
58. Glasser F, Doreau M, Maxin G, Baumont R. (2013). Fat and fatty acid content and composition of forages: A meta-analysis. *Anim Feed Sci Technol* 185:19-34.
59. Hanson GD, Cunningham LC, Morehart MJ, Parsons RI. (1998). Profitability of moderate intensive grazing of dairy cows in the Northeast. *J Dairy Sci* 81: 821-829.
60. Harmon DL. (1992). Impact of nutrition on pancreatic exocrine and endocrine secretion in ruminants: a review. *J Anim Sci* 70:1290-1301.
61. Harmon DL, McLeod KR. (2001). Glucose uptake and regulation by intestinal tissues: Implications and whole-body energetics. *J Anim Sci* 79(E Suppl):E59-E72.
62. Harris BL, Kolver ES. (2001). Review of Holsteinization on intensive pastoral dairy farming in New Zealand. *J Dairy Sci* 84(E Suppl):E56-E61.
63. Harvatine KJ, Boisclair YR, Bauman DE. (2009). Recent advances in the regulation of milk fat synthesis. *Animal* 3:40-54.
64. Heinrichs J. (2013). Penn State Particle Separator. Acceso: 17 Ago, 2015. <http://extension.psu.edu/animals/dairy/nutrition/forages/forage-quality-physical/separator>
65. Hirata M, Iwamoto T, Otozu W, Kiyota D. (2002). The effects of recording interval on the estimation of grazing behavior of cattle in a daytime grazing system. *Asian-australas J Anim Sci* 15:745-750.
66. Hoekstra NJ, Schulte RPO, Struik PC, Lantinga EA. (2007). Pathways to improving the N efficiency of grazing bovines. *Europ J Agron* 26:363-374.
67. Hoover WH. (1986). Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *J Dairy Sci* 69:2755-2766.
68. Huhtanen P, Kaustell K, Jaakkola S. (1994). The use of internal markers to predict total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. *Anim Feed Sci Technol* 48:211-227.
69. Huhtanen P, Ahvenjärvi S, Broderick GA, Reynal SM, Shingfield KJ. (2010). Quantifying ruminal digestion of organic matter and neutral detergent fiber using the omasal sampling technique in cattle. A meta-analysis. *J Dairy Sci* 93:3203-3215.

70. Jensen RG. (2002). Invited review: The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *J Dairy Sci* 85:295-350.
71. Kelley NS, Hubbard NE, Erickson KL. (2007). Conjugated linoleic acid isomers and cancer. *J Nutr* 137:2599-2607.
72. Kelsey JA, Corl BA, Collier RJ, Bauman DE. (2003). The effect of breed, parity, and stage of lactation on conjugated linoleic acid (CLA) in milk fat from dairy cows. *J Dairy Sci* 86:2588-2597.
73. Kolver ES, Muller LD. (1998). Performance and nutrient intake of high producing Holstein cows consuming pasture or a total mixed ration. *J Dairy Sci* 81:1403-1411.
74. Kolver ES. (2003). Nutritional limitations to increased production on pasture-based systems. *Proc Nut Soc* 62:291-300.
75. Kononoff PJ, Heinrichs AJ, Buckmaster DR. (2003). Modification of the Penn State forage and total mixed ration particle separator and the effects of moisture content on its measurements. *J Dairy Sci* 86:1858-1863.
76. Kris-Etherton PM, Yu S. (1997). Individual fatty acid effects on plasma lipids and lipoproteins: human studies. *Am J Clin Nutr* 65(Suppl):1628S-1644S.
77. Lapierre H, Lobley GE. (2001). Nitrogen recycling in the ruminant: A review. *J Dairy Sci* 84(E Suppl):E223-E236.
78. Licitra G, Hernandez TM, Van Soest PJ. (1996). Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Anim Feed Sci Technol* 57:347-358.
79. Littell RC, Henry PR, Ammerman CB. (1998). Statistical analysis of repeated measures using SAS procedures. *J Anim Sci* 76:1216-1231.
80. Lock AL, Garnsworthy PC. (2003). Seasonal variation in milk conjugated linoleic acid and $\Delta 9$ -desaturase activity in dairy cows. *Livest Prod Sci* 79:47-59.
81. Loor JJ, Soriano FD, Lin X, Herbein JH, Polan CE. (2003). Grazing allowance after the morning or afternoon milking for lactating cows fed a total mixed ration (TMR) enhances trans11-18:1 and cis9,trans11-18:2 (rumenic acid) in milk fat to different extents. *Anim Feed Sci Technol* 109:105-119.
82. Martin P, Bateson P. (1993). Measuring behavior. An introductory guide. Ed. Cambridge University Press. 2^a ed. Cambridge.
83. Mather IH. (2011). Secretion of milk constituents. En: Fuquay JW, Fox PF, McSweeney PLH. Encyclopedia of dairy sciences. Ed. Academic Press. 2^a ed. Oxford. pp. 373-380.
84. Meikle A, Kulcsar M, Chilliard Y, Febel H, Delavaud C, Cavestany D, Chilibraste P. (2004). Effects of parity and body condition at parturition on endocrine and reproductive parameters of the cow. *Reproduction* 127:727-737.
85. Meikle A, Cavestany D, Carriquiry M, Adrien ML, Artegoitia V, Pereira I, Ruprecht G, Pessina P, Rama G, Fernández A, Breijo M, Laborde D, Pritsch O, Ramos JM, de Torres E, Nicolini P, Mendoza A, Dutour J, Fajardo M, Astessiano AL, Olazábal L, Mattiauda D, Chilibraste P. (2013). Avances en el conocimiento de la vaca lechera durante el período de transición en Uruguay: un enfoque multidisciplinario. *Agrociencia (Uruguay)* 17:141-152.
86. Morales E, Soldado A, Gonzalez A, Martinez-Fernandez A, Dominguez-Vara I, de la Roza-Delgado B. (2010). Improving the fatty acid profile of dairy cow milk by combining grazing with feeding of total mixed ration. *J Dairy Res* 77:225-230.

87. Mould FL, Ørskov ER, Mann SO. (1983). Associative effects of mixed feeds. I. Effects of type and level of supplementation and the influence of the rumen fluid pH on cellulolysis in vivo and dry matter digestion of various roughages. *Anim Feed Sci Technol* 10:15-30.
88. Nielsen MO, Jakobsen K. (1993). Changes in mammary glucose and protein uptake in relation to milk synthesis during lactation in high- and low-yielding goats. *Comp Biochem Physiol* 106A:359-365.
89. Nocek JE, Tamminga S. (1991). Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effect on milk yield and composition. *J Dairy Sci* 74:3598-3629.
90. Nozière P, Glasser F, Sauvant D. (2011). In vivo production and molar percentages of volatile fatty acids in the rumen: a quantitative review by an empirical approach. *Animal* 5:403-414.
91. NRC. National Research Council. (2001). Nutrient requirements of dairy cattle. Ed. National Academy Press. 7^a ed. Washington.
92. O'Neill BF, Deighton MH, O'Loughlin BM, Mulligan FJ, Boland TM, O'Donovan M, Lewis E. (2011). Effects of a perennial ryegrass diet or total mixed ration diet offered to spring-calving Holstein-Friesian dairy cows on methane emissions, dry matter intake, and milk production. *J Dairy Sci* 94:1941-1951.
93. Palmquist DL, Lock AL, Shingfield K, Bauman DE. (2005). Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. *Adv Food Nut Res* 50: 179-217.
94. Pérez-Ruchel, A. (2014). Impacto de la inclusión de pasturas frescas de alta calidad en dietas de alto rendimiento de corderos en crecimiento: Efectos en el consumo, digestión y ambiente ruminal. XXIX Curso de Especialización de la Federación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Acceso: 18 Enero, 2016. http://fundacionfedna.org/sites/default/files/2014_premios.pdf
95. Pomiés N. (2014). Combinación de diferentes niveles de forraje fresco y ración totalmente mezclada en dietas de vacas lecheras: Efecto sobre el aprovechamiento digestivo. Tesis de Maestría en Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
96. Preston TR. (1995). Tropical animal feeding. A manual for research workers. Ed. FAO Publications Division, Roma.
97. Rajala-Schultz PJ, Saville WJA. (2003). Sources of variation in milk urea nitrogen in Ohio dairy herds. *J Dairy Sci* 86:1653-1661.
98. Reynal SM, Broderick GA. (2005). Effect of dietary level of rumen-degraded protein on production and nitrogen metabolism in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 88:4045-4064.
99. Reynolds CK. (2006). Production and metabolic effects of site of starch digestion in dairy cattle. *Anim Feed Sci Technol* 130:78-94.
100. Rigout S, Lemosquet S, van Eys JE, Blum JW, Rulquin H. (2002). Duodenal glucose increases glucose fluxes and lactose synthesis in grass silage-fed dairy cows. *J Dairy Sci* 85:595-606.
101. Roche JR, Blache D, Kay JK, Miller DR, Sheahan AJ, Miller DW. (2008). Neuroendocrine and physiological regulation of intake with particular reference to domesticated ruminant animals. *Nutr Res Rev* 21:207-234.
102. Rushen J, de Passillé AM, von Keyserlingk MAG, Weary DM. (2008). The welfare of cattle. Ed. Springer. Amsterdam.

103. Russell JB, Strobel HJ. (1987). Concentration of ammonia across cell membranes of mixed rumen bacteria. *J Dairy Sci* 70:970-976.
104. Ruxton CHS, Calder PC, Reed SC, Simpson MJA. (2005). The impact of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids on human health. *Nutr Res Rev* 18:113-129.
105. Salado EE, Bretschneider G, Cuatrin A, Eyherabide G. (2012a). Respuesta productiva de vacas lecheras alimentadas con distintos niveles de ración totalmente mezclada y pastura. 35° Congreso Argentino de Producción Animal, 9-12, Octubre, Córdoba, Argentina, P-177.
106. Salado EE, Bretschneider G, Cuatrin A, Cazzaniga D, Giordano G. (2012b). Composición en ácidos grasos de la leche de vacas alimentadas con distintos niveles de ración totalmente mezclada y pastura. 35° Congreso Argentino de Producción Animal, 9-12, Octubre, Córdoba, Argentina, P-175.
107. Salado EE, Bretschneider G, Gaggioti M. (2012c). Ambiente y digestión ruminal de vacas lecheras alimentadas con distintos niveles de ración totalmente mezclada y pastura. 35° Congreso Argentino de Producción Animal, 9-12, Octubre, Córdoba, Argentina, P-176.
108. Salado EE, Maciel M, Bretschneider G, Cuatrin A, Castignani H. (2014). Sistemas de alimentación combinando pastura y ración totalmente mezclada: respuesta productiva y comportamiento reproductivo de vacas lecheras. Artículo de divulgación. INTA. Rafaela. Acceso: 23 Noviembre, 2015. http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_sistema_alimentacion_combinando_pastura_y_tmr_re.pdf
109. Santana A, Cajarville C, Mendoza A, Repetto JL. (2016). Combination of legume-based herbage and total mixed ration (TMR) maintains intake and nutrient utilization of TMR and improves nitrogen utilization of herbage in heifers. *Animal* (aceptado para su publicación).
110. Schroeder GF, Couderc JJ, Bargo F, Rearte DH. (2005). Milk production and fatty acid profile of milkfat by dairy cows fed a winter oats (*Avena sativa* L.) pasture only or a total mixed ration. *New Zeal J Agric Res* 48:187-195.
111. Soder KJ, Rotz CA. (2001). Economic and environmental impact of four levels of concentrate supplementation in grazing dairy herds. *J Dairy Sci* 84:2560-2572.
112. Soder KJ, Muller LD. (2007). Case study: Use of partial total mixed rations on pasture-based dairy farms in Pennsylvania and New York. *Prof Anim Sci* 23:300-307.
113. Soder KJ, Brito AF, Rubano MD. (2013). Effect of supplementing orchardgrass herbage with a total mixed ration or flaxseed on fermentation profile and bacterial protein synthesis in continuous culture. *J Dairy Sci* 96:3228-3237.
114. Soriano FD, Polan CE, Miller CN. (2001). Supplementing pasture to lactating Holsteins fed a total mixed ration diet. *J Dairy Sci* 84:2460-2468.
115. Stern MD, Varga GA, Clark JH, Firkins JL, Huber JT, Palmquist DL. (1994). Evaluation of chemical and physical properties of feeds that affect protein metabolism in the rumen. *J Dairy Sci* 77:2762-2786.
116. Stockdale CR. (2010). Wastage of conserved fodder when feeding livestock. *Anim Prod Sci* 50:400-404.
117. St-Pierre NR, Cobanov B. (2007). A model to determine the optimal sampling schedule of diet components. *J Dairy Sci* 90:5383-5394.

118. Sutton JD, Reynolds CK. (2011). Small intestine of lactating ruminants. En: Fuquay JW, Fox PF, McSweeney PLH. Encyclopedia of dairy sciences. Ed. Academic Press. 2^a ed. Oxford. pp.989-995.
119. Tyrrell HF, Reid JT. (1965). Prediction of the energy value of cow's milk. *J Dairy Sci* 48:1215-1223.
120. Udén P, Colucci PE, Van Soest PJ. (1980). Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies. *J Sci Food Agric* 31:625-632.
121. Ulbricht TLV, Southgate DAT. (1991). Coronary heart disease: seven dietary factors. *Lancet* 338:985-992.
122. Valadares RFD, Broderick GA, Valadares Filho SC, Clayton MK. (1999). Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. *J Dairy Sci* 82:2686-2696.
123. Van Soest PJ. (1994). Nutritional ecology of the ruminant. Ed. Cornell University Press. 2^a ed. Ithaca.
124. Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci* 74:3583-3597.
125. Vibart RE, Fellner V, Burns JC, Huntington JB, Green JT. (2008). Performance of lactating dairy cows fed varying levels of total mixed ration and pasture. *J Dairy Res* 75:471-480.
126. Vibart RE, Burns JC, Fellner V. (2010). Effect of replacing total mixed ration with pasture on ruminal fermentation. *Prof Anim Sci* 26:435-442.
127. Wales WJ, Kolver ES, Thorne PL, Egan AR. (2004). Diurnal variation in ruminal pH on the digestibility of highly digestible perennial ryegrass during continuous culture fermentation. *J Dairy Sci* 87:1864-1871.
128. Wales WJ, Marett LC, Greenwood JS, Wright MM, Thornhill JB, Jacobs JL, Ho CKM, Auldist MJ. (2013). Use of partial mixed rations in pasture-based dairying in temperate regions of Australia. *Anim Prod Sci* 53:1167-1178.
129. Welch JG, Hooper AP. (1993). Ingestion of feed and water. En: Church DC. The ruminant animal. Digestive physiology and nutrition. Ed. Waveland Press 2^a ed. Prospect heights, Cap. 5, pp.108-116.
130. Williams CH, David DJ, Iismaa O. (1962). The determination of chromic oxide in faeces samples by atomic absorption spectrophotometry. *J Agric Sci (Camb)* 59:381-385.
131. Yan T, Mayne CS, Keady TWJ, Agnew RE. (2006). Effects of dairy cow genotype with two planes of nutrition on energy partitioning between milk and body tissue. *J Dairy Sci* 89:1031-1042.
132. Zarrin M, Wellnitz O, Bruckmaier RM. (2015). Short communication: Conjoint regulation of glucagon concentrations via plasma insulin and glucose in dairy cows. *Dom Anim Endocrinol* 51:74-77.

ANEXOS

Publicación I.

Mendoza A, Cajarville C, Repetto JL. (2016). Short communication: Intake, milk production, and milk fatty acid profile of dairy cows fed diets combining fresh forage with a total mixed ration. J Dairy Sci 99:1938-1944. Incluida en esta tesis con el aval de Elsevier.

Publicación II.

Mendoza A, Cajarville C, Repetto JL. (2016). Digestive response of dairy cows fed diets combining fresh forage with a total mixed ration. J Dairy Sci <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-11023> (aceptado para su publicación). Incluida en esta tesis con el aval de Elsevier.

Publicación III.

Mendoza A, Cajarville C, Repetto JL. (2016). Intake rate and behavior of dairy cows fed a total mixed ration and fresh forage. New Zeal J Agric Res (enviado, bajo revisión). Código de referencia del manuscrito: NZJA-2016-0192.