



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

“RECRÍA DE HEMBRAS LECHERAS: EFECTOS DEL REAGRUPAMIENTO SOCIAL SOBRE EL DESARROLLO CORPORAL, EL METABOLISMO Y EL COMPORTAMIENTO EN CONDICIONES DE UN CAMPO DE RECRÍA COMERCIAL”

Mariana Moratorio García y Santos

TESIS DE MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL

URUGUAY

2021



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

“RECRÍA DE HEMBRAS LECHERAS: EFECTOS DEL REAGRUPAMIENTO SOCIAL SOBRE EL DESARROLLO CORPORAL, EL METABOLISMO Y EL COMPORTAMIENTO EN CONDICIONES DE UN CAMPO DE RECRÍA COMERCIAL”

Mariana Moratorio García y Santos

Carolina Fiol
Directora de Tesis

Rodolfo Ungerfeld
Co-director

Mariana Carriquiry
Co-directora

2021

**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE
DEFENSA DE TESIS**

Lourdes Adrién; (PhD)

Facultad de Veterinaria, Udelar- Uruguay

Carolina Viñoles; (PhD)

Polo Agroforestal, Udelar- Uruguay

Genaro Miranda-de la Lama; (PhD)

Universidad de Zaragoza- España



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay



ACTA DE TESIS DE MAESTRÍA

ORIENTACIÓN: PRODUCCIÓN ANIMAL

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: PLATAFORMA VIRTUAL, 17/09/2021

TRIBUNAL: Dra. Lourdes Adrien, Dra. Carolina Viñoles, Dr. Genaro Miranda-de la Lama

CI	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
4862773-3	MORATORIO GARCIA Y SANTOS, MARIANA	S.S.S	12

TRIBUNAL

FIRMA

.....Dr. Genaro Miranda-de la Lama.....

.....Dra. Carolina Viñoles.....

.....Dra. Lourdes Adrien.....

NOTA: La calificación mínima para aprobar la defensa es B.B.B (6)

AGRADECIMIENTOS

A Caro, mi gran tutora, por haberme formado y estar más que presente en todas las etapas, hizo un trabajo excepcional.

A mis cotutores Rodolfo Ungerfeld y Mariana Carriquiry, agradezco la formación académica brindada, fueron muy buenos maestros.

A Ana, Fede, Majo y Turco (tesistas de grado), por su gran ayuda en el trabajo de campo y los divertidos momentos compartidos.

Al Campo de Recría de Montes, la ANPL, Dr. Rafael Capozzoli e Ing. Agr. Hernan Armand- Ugón, por haber permitido que realizáramos el trabajo experimental con todo lo que eso implica. En especial a los que estuvieron siempre, Juan y Ravera, el encargado y el peón del campo.

A Martín Aguerre, por enseñarme y ayudar con el manejo de la pastura, y Juan Dayuto por su colaboración en el muestreo.

A Andrea Fernández, Claudia Menezes y Gretel Ruprechter, por su gran ayuda en el laboratorio.

A todos los docentes del IPAV, siempre dispuestos a escuchar y contribuir acerca del trabajo.

A Fernando Perdigón y al personal del Campo Experimental de Mígues, por permitir el uso del laboratorio y alojar a los tesistas durante el trabajo de campo.

Al programa de Posgrados de Facultad de Veterinaria, por la oportunidad de realizar la Maestría, a la Comisión Académica de Posgrado (CAP) por la beca otorgada y a la Comisión Sectorial de Investigación científica (CSIC) por la financiación del proyecto.

Por último, a mi pilar más importante; mis padres, familia y amigos, por estar siempre conmigo, creer en mí, y sobre todo por mimarme. A "Magoo", mi pareja y amigo, quien vivió de cerca todo el trabajo y estuvo en las buenas y en las malas, siempre acompañando y alentándome.

A todos, ¡gracias!

INDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	5
Recría de hembras en el sistema de producción de leche.....	5
Desarrollo corporal y reproductivo en vaquillonas de leche	5
Reagrupamientos Sociales en rumiantes	7
Efectos de los RS sobre el comportamiento ingestivo, social y postural	8
Efectos de los RS sobre parámetros productivos y reproductivos	10
Regulación endócrino-metabólica del desarrollo en las vaquillonas	12
Respuesta al estrés en rumiantes	13
CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA	16
HIPÓTESIS	17
OBJETIVOS	17
Objetivo general	17
Objetivos específicos	17
ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
Diseño experimental y manejo de los animales.....	18
Determinaciones	20
Comportamiento social.....	20
Comportamiento ingestivo y postural	21
Desarrollo corporal y reproductivo.....	22
Metabolismo energético y proteico e indicadores de estrés	22
Análisis estadísticos	22
RESULTADOS	23-38
DISCUSIÓN.....	38-43
CONCLUSION.....	44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44-56
ANEXO 1	56-82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Disponibilidad promedio de la pastura de ambos potreros.....	19
Tabla 2. Parámetros de desarrollo corporal y respuestas reproductivas.....	24
Tabla 3. Concentración de hormonas y metabolitos.....	28
Tabla 4. Frecuencia de actividades de comportamiento ingestivo y postural.....	31
Tabla 5. Cantidad de interacciones sociales.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Altura de la cruz (AC) y condición corporal (CC).....	25
Figura 2. Primer celo detectado.....	26
Figura 3. Concentraciones de glucosa, urea y ácidos grasos no esterificados (AGNE).....	29
Figura 4. Comportamiento ingestivo.....	32
Figura 5. Comportamiento postural.....	34
Figura 6. Cantidad de interacciones agonistas, afiliativas y totales.....	37

RESUMEN

El objetivo de la presente tesis fue determinar los efectos del reagrupamiento social (RS) sobre el desarrollo corporal y reproductivo, el comportamiento social e ingestivo, el metabolismo energético y el estrés en terneras-vaquillonas manejadas en un campo de recría comercial. Para esto se utilizaron 83 terneras lecheras de raza Holando, que fueron divididas en dos grupos homogéneos: grupo sin reagrupamiento (Control, CON; n = 14 + 5 “volantes fijas”) y grupo reagrupado (RA; n = 14 + 5 “volantes intercambiadas”). En el grupo RA se intercambiaron las 5 vaquillonas “volantes” por otras 5 desconocidas cada 21 días (total = 10 RS; día 0 = primer RS). El día previo y posterior a cada RS se monitoreó el comportamiento ingestivo y postural mediante scan-sampling cada 10 min durante 8 horas. El comportamiento social fue determinado el día del RS y 7 días después de cada uno, a partir de un muestreo continuo durante 2 horas. El peso vivo (PV), condición corporal (CC), altura a la cruz (AC), y ganancia diaria de peso (GDP), además de diferentes hormonas y metabolitos sanguíneos, se registraron en cada RS, y se colocaron parches para la detección de celo a partir de que las vaquillonas alcanzaron los 200 kg. La AC tendió a ser mayor ($P = 0,06$) en el RS 8 (122 vs 120 cm $\pm 1,8$) y fue mayor ($P = 0,01$) en el RS 9 (123 vs 120 cm $\pm 1,8$) y 10 (124 vs 122 cm $\pm 1,8$), mientras que la CC fue mayor ($P = 0,01$) en el RS 4 ($3,5$ vs $3,2 \pm 0,15$) y 5 ($3,4$ vs $3,1 \pm 0,15$) en las vaquillonas CON que en las RA. Las vaquillonas CON presentaron el 1er celo más tempranamente (93 ± 9 d vs 126 ± 14 d; $P < 0,05$), y tuvieron una mayor proporción de celos acumulados que las vaquillonas RA ($0,69$ vs $0,48 \pm 0,05$; $P = 0,01$). Las concentraciones de IGF-1 ($171,3$ vs $120,0$ ng/mL $\pm 10,1$), glucosa ($4,3$ vs $4,2$ mmol/L $\pm 0,07$) y albúmina ($30,0$ vs $28,6$ g/L $\pm 0,6$) fueron mayores en las vaquillonas CON que en las RA ($P < 0,05$). Por otro lado, la concentración de AGNE fue mayor en las vaquillonas RA que en las CON ($0,35$ vs $0,30$ mmol/L $\pm 0,04$; $P < 0,05$), y fue mayor en el RS 3 ($0,6 \pm 0,09$ vs $0,3$ mmol/L $\pm 0,06$), 5 ($0,5 \pm 0,08$ vs $0,3$ mmol/L $\pm 0,05$) y 7 ($0,4$ vs $0,3$ mmol/L $\pm 0,05$) ($P < 0,05$), en las vaquillonas RA que en las CON. Las vaquillonas RA estuvieron mayor proporción del tiempo comiendo ($0,45$ vs $0,33 \pm 0,01$), pero menos tiempo rumiando ($0,21$ vs $0,24 \pm 0,01$) y echadas ($0,12$ vs $0,14 \pm 0,01$) que las vaquillonas CON ($P < 0,01$). A su vez, las vaquillonas RA realizaron más interacciones agonistas que las CON ($2,2$ vs $1,8 \pm 0,7$; $P = 0,03$), mientras que las vaquillonas CON realizaron más interacciones afiliativas ($2,7$ vs $2,1 \pm 0,6$; $P < 0,01$) a lo largo de todo el experimento. En conclusión, los RS frecuentes tuvieron impactos negativos sobre el desarrollo corporal y reproductivo, y el metabolismo energético en vaquillonas de leche. A su vez, las vaquillonas reagrupadas presentaron alteraciones del comportamiento social, ingestivo y postural, indicativas de mayores niveles de estrés, asociadas posiblemente a la inestabilidad social generada por los RS frecuentes.

ABSTRACT

The aim of this thesis was to determine the effects of frequent social regroupings (SR) on body and reproductive development, social and ingestive behavior, metabolic status and stress on dairy heifers managed in a commercial farm. A total of 83 heifers were used and allocated to 2 homogeneous groups: 1) Control (CON; $n = 14 + 5$ "fix" heifers) and 2) Regrouped (RA; $n = 14 + 5$ "exchanged" heifers), in which "exchanged" heifers were switched for 5 "novel heifers" every 21 d (total = 10 SR; Day 0 = SR 1). The day before and after each SR, ingestive and postural behaviors were registered, through scan sampling every 10 min for 8 hours. Social behavior was determined the day of SR and 7 days after SR, through a continuous sampling for 2 hours. In each SR, the BW, ADG, withers height (WH) and body condition score (BCS) were registered, blood hormones and metabolites determined. Date at first heat and later heats were registered by patches that were collocated when heifers reached 200 kg. Withers height tended to be greater ($P = 0.06$) in SR 8 (122 vs 120 cm \pm 1.8) and was greater ($P = 0.01$) in SR 9 (123 vs 120 cm \pm 1.8) and 10 (124 vs 122 cm \pm 1.8), while BCS was greater ($P = 0.01$) in SR 4 (3.5 vs 3.2 \pm 0.15) and 5 (3.4 vs 3.1 \pm 0.15), in CON than RA heifers. Control heifers showed first heat earlier (93 \pm 9 d vs 126 \pm 14 d; $P < 0.05$) and presented greater cumulative estrus than RA (0.69 vs 0.48 \pm 0.05; $P = 0.01$). Insulin growth factor-1 (171.3 vs 120.0 ng/ml \pm 10.1), glucose (4.3 vs 4.2 mmol/l \pm 0.07) and albumin (30.0 vs 28.6 g/l \pm 0.6) concentrations were greater in CON than RA ($P < 0.05$). In contrast, NEFA concentration was greater in RA than CON (0.35 vs 0.30 mmol/l \pm 0.04; $P < 0.05$), and RA had greater NEFA than CON in SR 3 (0.6 \pm 0.09 vs 0.3 mmol/l \pm 0.06), 5 (0.5 \pm 0.08 vs 0.3 mmol/l \pm 0.05) and 7 (0.4 vs 0.3 mmol/l \pm 0.05) ($P < 0.05$). Regrouped heifers were observed more times eating (0.45 vs 0.33 \pm 0.01), but less times ruminating (0.21 vs 0.24 \pm 0.01) and lying (0.12 vs 0.14 \pm 0.01) than CON ($P < 0.01$). In addition, RA heifers made more agonistic interactions than CON heifers (2.2 vs 1.8 \pm 0.7; $P = 0.03$), and made less affiliative interactions than CON (2.1 vs 2.7 \pm 0.6; $P < 0.01$) along the study. In conclusion, frequent SR had negative impacts on body and reproductive development, metabolic status and determined altered behavioral patterns in dairy heifers. Changes in behavior along the SR may be related to greater levels of social instability in RA heifers.

INTRODUCCIÓN

Durante el período 2011-2019 se produjeron cambios importantes en la producción lechera en Uruguay, incluyendo un aumento del número de vacas en ordeño, de la productividad individual, a la vez que disminuyó la superficie total de tambos y el número de predios lecheros (DIEA, 2020). En el 2019 se mantuvo la producción general respecto a años anteriores, y existió un mejor rendimiento por vaca en ordeño y vaca masa. La producción obtenida en predios de lechería comercial en el 2019 se estimó en 2.168 millones de litros y menor cantidad de tambos remitieron leche a la industria. Aun así, se evidenció un aumento de la cantidad de litros remitidos, registrando un total de 1.846 millones de litros de leche (DIEA, 2020). En general, el incremento de la productividad ha ido acompañada de una mejora en el plano de alimentación de los animales (Chilibroste y Battezzore, 2014).

En los sistemas de producción de leche, la recría de las hembras asegura la continuidad y el crecimiento del tambo, además de representar una etapa esencial en el futuro productivo y reproductivo de la vaca (Berra, 2005; Le Cozler et al., 2008). A nivel mundial, se reporta que los productores lecheros reemplazan aproximadamente anualmente entre el 25 y 35% de sus hembras (Le Cozler et al., 2008). La eficiencia en este período se relaciona con la posibilidad de mantener bajos costos sin perjudicar el futuro potencial productivo y reproductivo del animal (Berra, 2005; Gojjam et al., 2011). Específicamente, el crecimiento y desarrollo de la ternera y vaquillona de leche influye sobre su desempeño productivo y reproductivo futuro, tanto en la primera lactancia como a lo largo de todo el periodo productivo (Swanson, 1967; Zanton y Heinrichs, 2005; Boulton et al., 2017). En ese sentido, uno de los principales objetivos durante la recría es que las vaquillonas comiencen a producir leche lo antes posible (Sejrsen y Purup, 1997) y que esto se logre con un peso corporal y desarrollo esquelético óptimos (Lagger, 2010). De este modo, disminuye la cantidad de animales de reemplazo (considerados improductivos) a mantener en el rodeo, se reducen los costos de la crianza (Tozer y Heinrichs, 2001), se genera mayor cantidad de animales para reposición y disminuye el intervalo intergeneracional (Lagger, 2010).

Muchos factores influyen sobre el desempeño de las terneras y vaquillonas durante el periodo de recría, y dentro de estos, los cambios en el ambiente social de los animales han demostrado tener impacto sobre diferentes parámetros comportamentales, así como sobre el crecimiento y desarrollo en dichas categorías de animales (DeVries, 2010; Greter et al., 2010; Fiol et al., 2017, 2019). En este sentido, los reagrupamientos sociales (RS), que son frecuentes en la etapa de recría, tienen consecuencias negativas sobre el

desarrollo corporal y el comportamiento (Veissier et al., 2001; Raussi et al., 2005; Bach et al., 2006) de las vaquillonas. En cada RS se produce una desestabilización social, que determina que los animales nuevamente deban establecer el orden jerárquico, lo que puede implicar diferentes grados de estrés en los animales (Veissier et al., 2001; Grant y Albright, 2001; Raussi et al., 2005; Bach et al., 2006; von Keyserlingk et al., 2008; Proudfoot y Habing, 2015).

En Uruguay, los animales para reposición -terneras y vaquillonas- son aproximadamente el 26% del total de animales del rodeo (DIEA, 2020). El manejo de la recría en el propio establecimiento puede ser problemático para el productor, debido fundamentalmente a la escasez de superficie y a la falta de mano de obra para destinar a dicha categoría (Álvarez y Astigarraga, 2006). En ese contexto, a partir del año 1980, se comenzó a implementar en Uruguay la modalidad de los campos de recría como alternativa para dichos productores (Álvarez, 1996). Los campos de recría son establecimientos en donde el productor envía sus terneras con un peso vivo (PV) mínimo de entre 120 a 150 kg, y/o una edad determinada, y se las mantiene hasta la categoría de vaquillonas, aproximadamente en el séptimo mes de gestación, momento en el cual son trasladadas nuevamente al establecimiento de origen. Esto permite incrementar la superficie disponible para el rodeo en ordeño en el tambo, aumentando el número de vacas en ordeño y por lo tanto la cantidad de leche producida por superficie en el tambo (Álvarez, 1996). Durante este período, los campos de recría deben encargarse del manejo nutricional, sanitario y reproductivo de los animales (Costa et al., 2010).

En los campos de recría se mezclan terneras y vaquillonas de diferentes orígenes que son agrupadas al momento del ingreso de acuerdo con el PV y la edad. Posteriormente, durante la estadía en el campo de recría muchas veces se realizan nuevos reagrupamientos en base a diferentes criterios, como son la evolución de PV y la oferta de alimento. De acuerdo con la bibliografía consultada, no existen estudios en los que se evalúe el impacto de los RS frecuentes sobre el desarrollo corporal y reproductivo a lo largo de la recría en ganado lechero. A su vez, en Uruguay, si bien la modalidad de los campos de recría se encuentra ampliamente difundida a nivel de los productores de leche, no existen estudios que evalúen el impacto de diferentes manejos a lo largo de la estadía en el campo de recría sobre el crecimiento y desarrollo de las vaquillonas. Es de esperar que los RS frecuentes repercutan en forma negativa en el desarrollo corporal y reproductivo, lo que estaría mediado por cambios comportamentales y metabólicos. Por tanto, la presente tesis de Maestría tuvo como objetivos evaluar los efectos de los RS frecuentes sobre el desarrollo corporal y reproductivo, el patrón de comportamiento, y el metabolismo energético y proteico en vaquillonas mantenidas en un campo de recría comercial.

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Recría de hembras en el sistema de producción de leche

La recría es el periodo comprendido entre el desleche y el primer servicio de las vaquillonas (Le Cozler et al., 2008). Se encuentra documentado que la disminución de la edad al primer servicio se asocia a una mayor producción de leche tanto en la primera lactancia como a lo largo de la vida productiva de la vaca (Swanson, 1967; Sejrsen y Purup, 1997). Por tanto, uno de los principales objetivos durante la recría es que las vaquillonas alcancen su primer servicio a una edad y peso vivo (PV) óptimos (Sejrsen y Purup, 1997), logrando así una disminución en la cantidad de animales de reemplazo (considerados improductivos) a mantener en el rodeo, y reduciendo los costos de la crianza (Tozer y Heinrichs, 2001). A su vez, se obtiene una mayor cantidad de animales para reposición y disminuye el intervalo intergeneracional (Lagger, 2010). En Uruguay, los vientres de reposición como vaquillonas y terneras representan el 26% de la estructura del rodeo, por lo tanto, una falla en esta categoría compromete la producción futura (DIEA, 2020).

Diversos factores influyen sobre el desempeño productivo y reproductivo de las vaquillonas de leche. A continuación, se presentan las principales características a considerar para un adecuado desarrollo corporal y reproductivo de las hembras a lo largo del período de recría.

Desarrollo corporal y reproductivo en vaquillonas de leche

El crecimiento y desarrollo de la ternera y vaquillona de leche es de gran importancia debido a que influye directamente sobre el desempeño reproductivo y productivo tanto en la primera lactancia como a lo largo de todo el periodo productivo de la hembra (Swanson, 1967; Zanton y Heinrichs, 2005; Boulton et al., 2017). En ese sentido, uno de los principales objetivos en la recría es que las vaquillonas comiencen a producir leche lo antes posible, debiéndose lograr un primer servicio y parto de las vaquillonas a los 15 y 24 meses de edad, respectivamente, para alcanzar mayor número de lactancias disminuyendo así su vida improductiva (Sejrsen y Purup, 1997). A su vez, es necesario lograr un peso corporal óptimo de las vaquillonas, siendo ideal alcanzar el 60% del PV adulto, es decir 350 kg al primer servicio, y un 82% del PV adulto al primer parto en vaquillonas de raza Holando (PV adulto = 500 kg; van Amburgh et al., 1998).

El desarrollo esquelético es otro de los factores a considerar durante la recría de las hembras lecheras. Las vaquillonas de reemplazo deberían tener un tamaño corporal adecuado hacia los 22 a 24 meses de edad para asegurar una producción aceptable durante la primera lactancia y reducir la incidencia de distocias (Hoffman et al., 1992). Para lograr dicho objetivo, diferentes autores reportan que el desarrollo esquelético de las hembras, evaluado a través de la

altura a la cruz (AC), debería estar en el entorno de los 124-126 cm en vaquillonas Holando al momento del servicio (15 meses de edad) y de 138-141 cm al momento del parto (Heinrichs y Hargrove, 1987; Hoffman et al., 1992; Hoffman 1997). Por tanto, a partir del logro de una edad, un PV y un desarrollo esquelético óptimos al primer servicio, se puede reducir la etapa improductiva y se maximiza la producción de leche en la primera lactancia y a lo largo de la vida productiva del animal (Berra, 2005; Le Cozler et al., 2008; Lager, 2010). En los últimos años, la edad al primer parto de las vaquillonas lecheras en Uruguay ha disminuido: el número de vaquillonas que pare por primera vez con menos de 30 meses de edad aumentó a un 61% en el año 2016, siendo un 20% mayor que en el año 2012 (Sotelo, 2017).

Para lograr los objetivos mencionados en relación con la edad al primer servicio es necesario que las hembras se encuentren ciclando de forma regular previo al inicio de los servicios (Byerley et al., 1987). En ese sentido, los mismos autores reportaron que vaquillonas después de su tercer estro presentaron mayores tasas de preñez que vaquillonas después de su primer estro (78% y 57%, respectivamente). La pubertad en vaquillonas se define como la edad en que ocurre el primer estro acompañado de una ovulación espontánea (Hafez, 2000), en donde inician su madurez sexual y pueden reproducirse (Arthur et al., 1991). A nivel internacional, se ha reportado que las vaquillonas Holando alcanzan la pubertad entre los 9 y 11 meses de edad con un promedio de 250 a 280 kg de PV (Sejrsen y Purup, 1997). En estudios realizados durante la década del '70 se sugería que las vaquillonas iniciaban su actividad sexual cuando alcanzaban un desarrollo del esqueleto adecuado más que una determinada edad (Pritchard et al., 1972, citado por Bath et al., 1978), pero actualmente se consideran el PV y a la edad como factores desencadenantes del inicio de la actividad cíclica (Sejrsen y Purup, 1997). La edad a la pubertad en vaquillonas se encuentra altamente influenciada por las tasas de ganancias de PV prepubertad (Greer et al., 1983; Yelich et al., 1996). A su vez, el mayor PV al destete influye positivamente sobre la edad a la pubertad (Granger et al., 1990). En ese sentido, en numerosos estudios se ha determinado que la edad a la pubertad es menor cuanto mayor sea la ganancia diaria de peso (GDP) prepubertad y el PV al destete (Ferrel, 1982; Greer et al., 1983; Granger et al., 1990).

Existen múltiples factores que influyen sobre el crecimiento y desarrollo de las vaquillonas durante la recría, incluyendo factores nutricionales, de manejo, sanitarios, la genética, y diversos factores ambientales. Dentro de los factores de manejo, los cambios en el ambiente social de las terneras y vaquillonas, o los reagrupamientos sociales (RS) tienen un impacto directo sobre diferentes parámetros de desarrollo y comportamentales en vaquillonas (Raussi et al., 2005; Bach et al., 2006). Los rumiantes son animales gregarios (Bouissou, 1972), que establecen un orden jerárquico para utilizar los recursos generando menos conflictos (Hurnik et al., 1995). En cada RS se genera una desestabilización social, lo que puede afectar el comportamiento y el desarrollo

corporal (Veissier et al., 2001; Grant and Albright, 2001; Raussi et al., 2005; Bach et al., 2006; von Keyserlingk et al., 2008), generando estrés en los animales (Proudfoot y Habing, 2015). De acuerdo con la bibliografía consultada, los estudios que evalúen el impacto de los RS frecuentes sobre el desarrollo corporal en vaquillonas de leche son escasos (Bach et al., 2006), y no existen antecedentes vinculados a las posibles consecuencias de dicho manejo sobre el desarrollo reproductivo ni sobre los posibles mediadores de dichos efectos (Hubbard et al., 2021).

A continuación, se presentan los principales antecedentes vinculados a los efectos de los RS en rumiantes.

Reagrupamientos sociales en rumiantes

Los rumiantes son animales sociales y gregarios, en los cuales el establecimiento de jerarquías forma parte del comportamiento animal, ayudando a reducir conflictos y peleas (Bouissou et al., 2001). La jerarquía social puede definirse como un orden de rangos basado en relaciones de dominancia y subordinación, que permite la mejor utilización de los recursos (Hurnik et al., 1995). Los encuentros entre individuos durante el establecimiento de la jerarquía son más que nada físicos, y es de esperar que, si el ambiente y la composición del grupo no varían, los vínculos formados entre los animales se mantengan estables (Hurnik et al., 1995). Por su parte, la dominancia es una relación entre dos individuos, donde el comportamiento de uno puede ser inhibido por el comportamiento del otro (Kaufmann, 1983). Un animal es considerado dominante si este gana significativamente más veces sobre otro individuo en encuentros físicos (De Vries, 1998). Un individuo con una posición jerárquica en un grupo podría tener una posición diferente en otro (Drews, 1993). Según algunos autores las características como la edad (González et al., 2008, Sárová et al., 2013) y el PV (Dickson et al., 1966; Phillips y Rind, 2002) influyen sobre la dominancia entre los individuos de un grupo (Brouns y Edwards, 1994). Sin embargo, en otros estudios no se encontró relación entre dichos factores y el estatus social (Schein y Fohorman, 1955; Galindo y Broom, 2000). Schein y Fohrman (1955) reportaron que un animal puede amenazar al otro sin obtener respuesta (agresión unidireccional) y que la dominancia social puede ser lineal y transitiva (ej. si el animal $A > B$ y $B > C$ entonces $A > C$). Por su parte, De Vries (1995) definió que la dirección y la transitividad son propiedades clásicas de la dominancia social, pero existen también jerarquías de tipo no lineales.

El RS es una práctica común en diferentes sistemas de producción. En sistemas lecheros, el RS de las vacas es realizado con el fin de facilitar el manejo durante el período de transición, así como para lograr lotes más homogéneos de acuerdo con la etapa de lactación (Bøe y Færevik, 2003). A su

vez, durante la etapa de recría, las vaquillonas pueden ser reagrupadas en varias ocasiones de acuerdo con la evolución de su PV u otros criterios (Raussi et al., 2005). Los cambios determinados por el ingreso de nuevos animales pueden afectar la estabilidad social del grupo incrementando las interacciones, tanto de tipo físicas (agonistas), como no físicas (Kondo y Hurnik, 1990; Cook y Nordlund, 2004). Luego de cada reagrupamiento, los animales requieren de 3 a 14 días para reestablecer el orden social: durante el primer día, las vacas lecheras incrementan la cantidad de los comportamientos agonistas como empujones, vocalizaciones, cabezazos y desplazamientos del comedero (Grant y Albright, 2001). Kondo y Hurnik (1990) determinaron que, a los 4 días del reagrupamiento, en las vacas predominan las interacciones no físicas (lamidos, olfateo). Cuando el tamaño del grupo aumenta o si existe competencia por el alimento, se prolonga el tiempo necesario para generar la estabilidad social (Kondo y Hurnik, 1990). Jensen y Proudfoot (2017) también trabajaron con diferentes tamaños de grupos, y observaron que la cantidad de interacciones agonistas era mayor en las vacas introducidas en el grupo de mayor tamaño (n = 24) que en el más chico (n = 6). A su vez, en el grupo de mayor tamaño las vacas estuvieron menos tiempo echadas y mayor tiempo caminando en los primeros dos días posteriores a la introducción de los nuevos animales. Por lo tanto, los efectos sobre el comportamiento social en vacas reagrupadas varían según el tamaño del grupo y los días en que se formó el nuevo grupo o se reagrupó con animales nuevos.

Por su parte, el vínculo social previo podría influir sobre los efectos de los RS. En ese sentido, Færevik et al. (2007) mezclaron terneros que ya se conocían entre sí con terneros desconocidos, reportándose que los terneros conocidos se encontraron con mayor frecuencia descansando cerca e tuvieron mayor cantidad de interacciones afiliativas como lamidos y olfateos. En contraposición, entre los terneros desconocidos y pertenecientes a los grupos de menor tamaño se observaron mayor cantidad de reacciones agonistas (Færevik et al., 2007). Por otro lado, O'Connell et al. (2008) demostraron que las vacas lecheras que se mantuvieron de a pares durante una semana posparto y luego fueron introducidas en un grupo estable, formaron un fuerte vínculo y se mantuvieron cercanas durante el primer mes, a la vez que fueron más activas comiendo que aquellas vacas que fueron introducidas en el mismo momento, pero previamente estaban en forma individual. Por tanto, la existencia de un vínculo previo genera menos efectos negativos que cuando los animales reagrupados son desconocidos.

Efectos de los RS sobre el comportamiento ingestivo, social y postural

En la mayor parte de los estudios relacionados a los efectos de los RS en rumiantes se evaluaron los cambios en el patrón de comportamiento, tanto postural, ingestivo y social resultante del ingreso de nuevos animales (Veissier

et al., 2001; Gupta et al., 2008; von Keyserlingk et al. 2008; Schirmann et al., 2011). En vacas lecheras preparto, el reagrupamiento determinó una disminución del 9% en el tiempo de rumia junto con un menor tiempo de descanso y un incremento del comportamiento agresivo, en las vacas que fueron trasladadas a un nuevo potrero que en aquellas que quedaron fijas y recibieron a los nuevos animales (Schirmann et al., 2011). En el estudio realizado por von Keyserlingk et al. (2008) también se reportó una disminución en el tiempo de consumo y del tiempo echadas y un mayor número de interacciones agonistas en las vacas nuevas que ingresaban al grupo estable, durante el primer día posterior al reagrupamiento. En forma similar, Gupta et al. (2008) reportaron que los novillos pasan más tiempo parados, comiendo y bebiendo, y menos tiempo echados durante los 2 primeros días luego de cada RS. En contraposición, Smid et al. (2019) no encontraron cambios en el tiempo en que los animales se mantuvieron echados, parados interactuando, ni comiendo durante los 3 días posteriores a la introducción de vacas Holando individualmente en un grupo estable. Los mismos autores observaron que el número de interacciones fue disminuyendo día a día, lo que podría sugerir que los animales se adaptaron al reagrupamiento y/o que hubo mayor número de interacciones durante el primer día luego de la introducción de las vacas nuevas. Recientemente, Nogues et al. (2020) introdujeron vaquillonas individualmente en un grupo estable de 12 vaquillonas desconocidas, y reportaron que las reagrupadas recibieron mayor cantidad de interacciones agonistas en las primeras 6 horas posteriores al RS que las vaquillonas no reagrupadas. Por otro lado, Fernández et al. (2007) reportaron que las cabras reagrupadas 3 veces aumentan la agresividad durante los primeros 2 días en los 3 RS, pero la producción de leche sólo disminuyó luego del primer RS. En suma, tanto en vacas como en cabras, se acentúa el comportamiento agonista luego de los RS.

Los RS frecuentes son una práctica común en muchos sistemas de producción, y varios estudios han evaluado sus efectos sobre el patrón de comportamiento, con el objetivo de evaluar si existe un acostumbamiento o habituación de los animales a dicha práctica. En vacas lecheras primíparas y multíparas se introdujeron de 2 a 4 vacas nuevas después del parto, los reagrupamientos se realizaban 2 veces por semana y se hizo un total de 23 RS (Gutmann et al., 2020). Se determinó que las vacas primíparas introducidas pasaron menos tiempo echadas que las primíparas residentes, pero en las multíparas introducidas recientemente se observó lo contrario (estuvieron más tiempo echadas que las multíparas residentes). En el caso de las vacas primíparas, los autores asociaron el menor tiempo de descanso con el estrés del primer parto sumado a que fueron trasladadas a un lugar desconocido con animales desconocidos, y fueron ordeñadas por primera vez. En cambio, las vacas multíparas no se afectaron negativamente, lo que indica que pueden tolerar

mejor la reagrupación en cuanto a parámetros de estrés, inmunológicos o metabólicos (Coonen et al., 2011; Silva et al., 2013; Walker et al., 2015; Chebel et al., 2016). En animales en crecimiento los RS frecuentes pueden ser una práctica común para homogeneizar lotes a lo largo del periodo de recría. En terneros reagrupados hasta 14 veces, Veissier et al. (2001) reportaron que los animales permanecieron menos tiempo echados y mayor tiempo caminando durante los primeros reagrupamientos, disminuyendo los efectos negativos a lo largo de los siguientes reagrupamientos. A su vez, estos autores encontraron que los terneros que fueron reagrupados más veces tendieron a ser dominantes durante su etapa adulta que aquellos animales que tuvieron menor cantidad de RS o fueron criados de manera aislada. En contraste, Raussi et al. (2005) observaron que las vaquillonas no se habituaron a los RS frecuentes, aumentando la cantidad de interacciones agonistas a lo largo de 16 RS. Es posible que las diferencias observadas en la adaptabilidad de los animales a los RS se deban a la diferente madurez sexual (Bouissou, 1977), o a cambios vinculados al desarrollo del comportamiento agonista (Veissier et al., 2001).

En suma, en la mayor parte de los estudios se reportaron alteraciones en el patrón del comportamiento ingestivo, postural y social en animales reagrupados frecuentemente, pero diversos factores (categoría, edad, cantidad de animales reagrupados, tamaño del grupo, cantidad de reagrupamientos, período entre reagrupamientos) determinan la magnitud de los efectos.

Efectos de los RS sobre parámetros productivos y reproductivos

El ambiente social en el cual se encuentran los animales influye sobre diferentes parámetros productivos en animales adultos (Sevi et al., 2001; von Keyserlingk et al., 2008), así como sobre el desarrollo corporal y reproductivo en animales en crecimiento (DeVries, 2010; Greter et al., 2010; Fiol et al., 2017, 2019). Los efectos del cambio en el ambiente social de los animales que sucede como consecuencia de los RS sobre diferentes parámetros productivos fueron evaluados mayoritariamente en animales adultos. En vacas primíparas se determinó que disminuyó la producción de leche 4,7% durante la segunda semana posterior al RS (Hasegawa et al., 1997). En forma similar, la producción de leche disminuyó 3,7 kg el día posterior al RS en vacas Holando en lactación (von Keyserlingk et al., 2008). En ovejas lecheras reagrupadas y reubicadas 3 veces con un intervalo de 7 días, se constató una disminución del 22% de la producción de leche el día posterior al primer reagrupamiento y reubicación (Sevi et al., 2001). Fernández et al. (2007) reagruparon cabras en producción hasta 3 veces cada 15 días, y concluyeron que la producción de leche disminuyó 0,29 kg solamente luego del primer RS. Por tanto, en diferentes especies, el RS afecta negativamente la producción de leche, pero solamente luego de la primera reagrupación, lo que podría indicar un cierto nivel de habituación a los RS.

Los trabajos en que se evaluaron los efectos de los RS frecuentes sobre el desarrollo corporal en rumiantes en crecimiento son muy escasos. Bach et al. (2006) monitorearon la evolución de PV y las GDP a lo largo de la etapa de recría en vaquillonas que fueron reagrupadas con vaquillonas más jóvenes y de menor peso, si no lograban el peso objetivo para pasar al siguiente lote. Dichos autores reportaron que las vaquillonas que fueron reagrupadas con animales más chicos obtuvieron mayores ganancias de peso que aquellas no reagrupadas. Por otra parte, en novillos reagrupados y reubicados 6 veces cada 14 días existió únicamente una tendencia a que bajara la GDP luego del tercer RS (Gupta et al., 2008). Por lo tanto, de acuerdo con los escasos estudios existentes, los resultados de los RS frecuentes sobre el desarrollo corporal no son consistentes, reportando tantos efectos positivos como negativos sobre la evolución del PV y las GDP.

La dominancia y el rango social han demostrado influir en la respuesta comportamental y en los efectos a nivel productivo determinados por distintos manejos, como los RS. En ese sentido, vacas de bajo rango social se encuentran más tiempo de pie que vacas de rango medio y alto, generando mayores lesiones podales y una menor tasa de supervivencia a las cojeras en las primeras (Galindo y Broom, 2000). En vaquillonas mantenidas en situaciones de alta competencia, las vaquillonas dominantes alcanzaron la pubertad antes que las subordinadas. A su vez, las vaquillonas dominantes presentaron un mayor desarrollo corporal y mayor glucemia que las subordinadas, además de cambios en el patrón de comportamiento ingestivo (Fiol et al., 2017, 2019). Los trabajos que evalúan los efectos del RS de acuerdo al rango social son escasos y con resultados variados. La disminución de la producción de leche en vacas lecheras primíparas reagrupadas ocurrió en las vacas subordinadas, pero no se encontraron efectos negativos de los RS en las vacas dominantes (Hasegawa et al., 1997). Por su parte, en cabras reagrupadas de rango social medio, existió mayor producción de leche que en las de bajo y alto rango (Fernández et al., 2007). Los autores lo explican debido a que las mismas sufrirían menor presión social que los animales de estatus inferior, a la vez que tendrían un gasto energético menor en comparación con las cabras más dominantes debido a que éstas últimas deben involucrarse en interacciones agresivas como forma de mantener su rango social. Por tanto, de acuerdo con los escasos trabajos reportados, los animales subordinados podrían verse más o menos afectados por los RS que los animales dominantes.

En suma, considerando que los RS frecuentes afectan la estabilidad del ambiente social y desencadenen una respuesta comportamental, es de esperar que los mismos impacten también sobre el desarrollo corporal y reproductivo en las vaquillonas.

Regulación endócrino-metabólica del desarrollo en las vaquillonas

Es de esperar que los RS frecuentes modifique las concentraciones de diferentes indicadores del metabolismo energético y proteico de las vaquillonas, y por lo tanto generen cambios en el desarrollo corporal y reproductivo de las vaquillonas. En este sentido, diversas hormonas metabólicas y metabolitos sanguíneos que influyen sobre el crecimiento y desarrollo corporal y reproductivo de las vaquillonas podrían estar mediando los efectos de los RS frecuentes sobre dichas variables.

El control endócrino de la pubertad está determinado por la maduración del hipotálamo y la pulsatilidad de la hormona luteinizante (LH), lo que desencadena el pico preovulatorio de LH y la ovulación (Day et al., 1987). Entre los 40 y 80 días anteriores a la primera ovulación se produce un incremento progresivo de la LH y los folículos ováricos comienzan a crecer bajo el estímulo de la hormona folículo estimulante (FSH), quienes a su vez aumentan la secreción de estradiol y provocan la primera ovulación (Rawlings et al., 2003). Por lo tanto, una vez que la vaquillona alcanza el desarrollo corporal y edad óptimos, y se desencadenan los cambios hormonales mencionados, comienza la ciclicidad. Desde el punto de vista hormonal, la hormona de crecimiento (somatotropina, GH) es una de las principales hormonas encargada de regular el crecimiento y desarrollo reproductivo (Taylor et al., 2004). La GH es secretada por la adenohipófisis y desencadena la síntesis del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1), la que a su vez ejerce una retroalimentación negativa sobre la hipófisis e hipotálamo inhibiendo la secreción de GH. A nivel del metabolismo adiposo la GH estimula la lipólisis, a diferencia de la IGF-1, que es estimuladora de la lipogénesis (Roche et al., 2009). La IGF-1 es secretada en su mayor parte por el hígado, y diferentes autores demostraron que en vaquillonas su concentración se correlaciona en forma positiva con la condición corporal (CC) durante el crecimiento prepuberal (Lammers et al., 1999; Sirotkin et al., 2018). A su vez, Velázquez et al. (2008) reportaron que la IGF-1 tiene efectos sobre el desarrollo y la función reproductiva de las vaquillonas, y las altas concentraciones dicha hormona estimulan la secreción de gonadotrofinas. La insulina, al igual que la IGF-1, es reguladora de la lipogénesis (Roche et al., 2009). A nivel reproductivo, el aumento de las concentraciones de IGF-1 e insulina se relaciona en forma directa con la tasa ovulatoria y el crecimiento folicular *in vivo* (Webb et al., 2004). El incremento de ambas hormonas también se asocia con una menor edad al primer celo y al primer servicio (Brickell et al., 2009), debido a que estimulan la secreción pulsátil de LH y la síntesis de estradiol (Schoppee et al., 1996). Por su parte, la leptina es una hormona secretada principalmente por el tejido adiposo y encargada de regular el consumo de alimento, el gasto energético y la deposición de grasa (Yamada et al., 2003). A su vez, también

tiene efectos a nivel reproductivo, estimulando la secreción de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y LH (Zieba et al., 2005). Sirotkin et al. (2018) demostraron que la leptina promueve la producción de estradiol en las vacas lecheras posparto que tienen mejor condición corporal.

La glucosa es la principal fuente de energía para el funcionamiento de los ovarios (Brickell et al., 2009). Además, son necesarios niveles adecuados de glucosa para que la insulina tenga efecto positivo sobre las concentraciones de LH (Dhuyvetter y Caton, 1996; González-Grajales et al., 2018). El colesterol es producido principalmente en el hígado, y Rayssiguier et al. (1988) determinaron que su concentración sanguínea es menor en vacas con problemas reproductivos y/o cuando existe acumulación de grasa en el hígado. La concentración de colesterol influye positivamente sobre las hormonas esteroideas, aumentando así, las tasas de concepción y preñez (Lammoglia et al., 1996).

En suma, en vaquillonas prepuberales las altas concentraciones de IGF-1, leptina, insulina y glucosa, se correlacionan positivamente con una menor edad a la pubertad.

Respuesta al estrés en rumiantes

Los RS sucesivos en animales generan inestabilidad, y por tanto estrés social (Proudfoot y Habing, 2015), en busca de nuevos vínculos jerárquicos. En ese sentido, los RS frecuentes podrían determinar la incapacidad del animal para realizar comportamientos naturales o generar otras alteraciones del bienestar animal (Barnett et al., 1993). El estrés se produce como respuesta a una amenaza (estresor) real o percibida, amenazante o benigna, que depende de los recursos adaptativos del individuo (McEwen, 1998). La respuesta comienza cuando el sistema nervioso central percibe una amenaza a la homeostasis del organismo, y como consecuencia se activa el eje simpaticoadrenal y el eje hipotálamo-hipofisis-adrenal (Mellor et al., 2000). El estrés puede clasificarse en relación con la duración del efecto como transitorio (agudo) o sostenido en el tiempo (crónico) (Moberg, 2000). El estrés crónico ocurre cuando el estresor mantiene su acción y el animal no es capaz de restablecer su homeostasis, determinando un amplio rango de respuestas fisiológicas y comportamentales (Dwyer y Bornett, 2004). Por tanto, la evaluación del estrés crónico requiere de la determinación de diferentes indicadores, incluyendo indicadores comportamentales, bioquímicos y hematológicos (Ceciliani et al., 2012). Las situaciones de inestabilidad social que generan los RS frecuentes son generadoras de estrés crónico (Gupta et al., 2005; Raussi et al., 2006).

Los animales sometidos a situaciones de estrés crónico presentan cambios comportamentales tales como aumento de agresividad, reacciones de huida,

disminución del apetito y de la rumia, del tiempo de descanso, e inhibición de comportamiento reproductivo (Sapolsky et al., 2000). En este sentido, como fuera mencionado anteriormente, en la mayor parte de los estudios realizados en rumiantes se reportó que los RS alteran el patrón de comportamiento ingestivo, postural y social (Veissier et al., 2001; Raussi et al., 2005; Gupta et al., 2008; von Keyserlingk et al. 2008; Schirmann et al., 2011).

En relación con los indicadores bioquímicos, el estrés crónico modifica la síntesis de Proteínas de Fase Aguda (PFA), las cuales son indicadoras de procesos inflamatorios y de estrés (Ceciliani et al., 2012). Las PFA se producen en los hepatocitos y tejidos periféricos y se clasifican de acuerdo a si su concentración aumenta (haptoglobinas, amiloide sérico A, proteína reactiva C) o disminuye (albúmina) como consecuencia del proceso inflamatorio (Petersen et al., 2004). Jawor et al. (2008) determinaron que las proteínas plasmáticas totales (PPT) aumentan en vacas lecheras tratadas por enfermedades. A su vez, diferentes metabolitos sanguíneos se encuentran asociados con la respuesta de estrés crónico. Los ácidos grasos no esterificados (AGNE) son indicadores del estatus energético en rumiantes, y su incremento en sangre se da como resultado de la lipomovilización (Agenäs et al., 2006). En situaciones de estrés, aumenta la lipólisis, y por tanto la cantidad de AGNE en sangre (Kang et al., 2017). Por su parte, el β -hidroxibutirato (BHB) es el cuerpo cetónico que se produce en el hígado que se encuentra en mayor proporción en los rumiantes (Duffield, 2000). El BHB aumenta cuando existe déficit de energía o incapacidad por parte del hígado de procesar los triglicéridos provenientes de la movilización de los lípidos (Meikle y col., 2013). A su vez, las altas concentraciones de AGNE y de BHB en sangre, así como la acumulación excesiva de triglicéridos en el hígado, se asocian a una baja fertilidad en vaquillonas (Drackley y Cardoso, 2014).

Se ha reportado que también hay cambios en la concentración de otros metabolitos, como el colesterol, la albúmina y la urea en rumiantes sometidos a condiciones de estrés. En un estudio en ratas, Brennan et al. (1996) reportaron que los niveles de colesterol en plasma aumentan en animales con estrés inducido. La urea en rumiantes se transforma principalmente en el hígado a partir de grupos aminos liberados a partir del catabolismo de los aminoácidos, por lo que el nivel de proteína en la dieta puede influir sobre su concentración (Preston et al., 1965). En el rumen la urea es reciclada y se utiliza para la síntesis de proteína microbiana (Stern et al., 1994). En diferentes estudios se ha determinado que tanto la concentración de urea como de albúmina pueden disminuir debido a altos niveles de estrés (Jazbec et al., 1990; Petersen et al., 2004; Celi et al., 2012).

Las respuestas al estrés social provocadas por los RS podrían modificar los requerimientos energéticos y, por tanto, el estado metabólico de los animales

(Moberg y Mench, 2000). En ese sentido, es de esperar que las vaquillonas que son reagrupadas frecuentemente alcancen un nivel de estrés que pueda verse reflejado en los metabolitos determinados, pero los antecedentes al respecto son escasos. Gupta et al. (2005) encontraron aumento de albúmina, urea y AGNE luego del primer reagrupamiento en novillos reagrupados 6 veces, mientras que el BHB y la glucosa aumentaron luego del sexto. Los autores asociaron dichos cambios a un aumento en la demanda energética de los novillos reagrupados.

En resumen, si bien los RS frecuentes modifican el patrón de comportamiento y afectan diferentes parámetros productivos en rumiantes, de acuerdo a la bibliografía consultada no existen estudios que evalúen los efectos de los RS frecuentes sobre el desarrollo corporal y reproductivo en forma conjunta en vaquillonas en crecimiento, y los posibles mediadores metabólicos y comportamentales implicados.

CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA

La recría de las hembras lecheras es una etapa de gran relevancia para el sistema productivo ya que esta categoría representa el futuro reemplazo de las vacas del rodeo lechero. El crecimiento y desarrollo de estas va a influir sobre su desempeño futuro tanto en la primera lactancia, como a lo largo de todo su periodo productivo (Swanson, 1967; Berra, 2005). Los cambios en el ambiente social de los animales que generan los RS frecuentes influyen sobre diferentes aspectos productivos y comportamentales, tanto durante la recría como en animales adultos (Veissier et al., 2001; Raussi et al., 2005; Bach et al., 2006; Grant y Albright, 2001; Silva et al., 2013). Sin embargo, de acuerdo a la bibliografía consultada, no existen estudios en que se evalúen los efectos de los RS frecuentes a lo largo de la recría sobre el desarrollo corporal y reproductivo ni sobre los posibles mediadores de dichos efectos, como son los indicadores de metabolismo y el patrón de comportamiento. En ese sentido, se espera que con cada RS se produzca una desestabilización social, generando respuestas de estrés que incluyan cambios comportamentales y metabólicos, los que a su vez repercutirán sobre el desarrollo corporal y reproductivo de las hembras. Considerando los cambios de la estructura jerárquica que se generan luego de cada RS, es de esperar que existan variaciones en los efectos de los RS de acuerdo con el rango social de las vaquillonas a lo largo de los RS.

Los campos de recría son establecimientos en los cuales ingresan terneras de varios orígenes que son agrupadas de acuerdo con diferentes criterios, incluyendo el PV y la edad. Posteriormente, durante la estadía en el campo de recría se realizan RS frecuentes en base a la evolución de PV y la oferta de forraje estacional. Por tanto, considerando que en dichos sistemas los RS son una práctica habitual, en la presente tesis se evaluaron los efectos de los RS frecuentes en terneras y vaquillonas manejadas en un campo de recría comercial.

HIPÓTESIS

Los RS frecuentes de las terneras y vaquillonas afectan negativamente el desarrollo corporal y retrasan la edad al primer celo, lo que se encuentra asociado a cambios en los niveles de metabolitos sanguíneos y hormonas metabólicas, a diferencias en el patrón de comportamiento ingestivo y social, relacionados con mayores niveles de estrés social.

Los cambios negativos generados como consecuencia de los RS frecuentes son más acentuados en los animales de menor rango social que en los de mayor rango social.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar si los RS frecuentes afectan el desarrollo corporal y reproductivo, el metabolismo energético y proteico, y el patrón de comportamiento en terneras-vaquillonas Holando manejadas en un campo de recría comercial.

Objetivos específicos

- 1) Determinar los efectos de los RS frecuentes en terneras y vaquillonas de la raza Holando mantenidas en un campo de recría a lo largo de 205 días sobre:
 - el desarrollo corporal (PV, AC, CC),
 - los parámetros reproductivos (edad al primer celo y proporción de celo acumulado),
 - indicadores del metabolismo energético y proteico (hormonas metabólicas y metabolitos sanguíneos) y
 - el patrón de comportamiento social, ingestivo y postural.

- 2) Comparar las consecuencias de los RS frecuentes en vaquillonas de alto y bajo rango social.

ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

El experimento contó con el aval de la Comisión de Experimentación Animal (Protocolo CEUAFVET-465), y fue realizado en el campo de recría de la Asociación Nacional de Productores de Leche (ANPL), localizado en Montes, Departamento de Canelones, Uruguay (34° S, 55° O). Se utilizaron las terneras pertenecientes a los productores asociados, que ingresaron al campo en el mes de agosto de 2018. El experimento tuvo un diseño de bloques al azar con dos tratamientos (con y sin reagrupamiento), comenzando en el mes de setiembre de 2018 y finalizando en el mes de mayo de 2019, totalizando 205 días de periodo experimental. A lo largo de dicho periodo, se realizó un RS cada 21 días (10 RS en total durante el periodo) en el grupo con reagrupamiento. La frecuencia de RS fue mayor que la utilizada en forma habitual en el campo de recría, pero la misma se estableció con el objetivo de maximizar el grado de inestabilidad social en el grupo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental y manejo de los animales

Se utilizaron 83 terneras de la raza Holando con 9 a 11 meses de edad, y 153 ± 16 kg de PV (media \pm DE). Las terneras provenían de 4 establecimientos lecheros diferentes. Luego de un periodo de adaptación (30 días) a las condiciones de manejo del campo de recría, las terneras fueron divididas en dos grupos homogéneos en edad, PV y establecimiento de origen:

1) sin reagrupamiento (Control, **CON**; $n = 14 + 5$ “volantes fijas”): las terneras fueron mantenidas desde el inicio hasta el final del experimento en forma conjunta, variando únicamente la localización del potrero.

2) con reagrupamiento (**RA**; $n = 14 + 5$ “volantes intercambiadas”): este grupo pretendía asemejar el manejo tradicional del campo de recría, pero estandarizando y maximizando la cantidad de reagrupamientos. Se intercambiaron los 5 animales “volantes” por otros 5 desconocidos cada 21 días desde el día 0 (primer RS) hasta el día 205 (total = 10 RS). Las 5 vaquillonas que se intercambiaban provenían del lote de animales seleccionados inicialmente ($n = 50$), y eran similares en PV y edad que las del grupo RA al inicio.

Los animales volantes en el grupo CON fueron incluidos con el objetivo de igualar el número de animales entre ambos grupos, y, al igual que las volantes del grupo RA no fueron considerados para las determinaciones de las diferentes variables. Los RS se realizaron entre las 8:00 y 10:00 am. El día de

cada RS, las vaquillonas del grupo RA eran trasladadas a las mangas para realizar el intercambio de las 5 vaquillonas, evitando que se cruzaran con otros animales. En el proceso se retiraban las 5 que habían sido incorporadas en el RS anterior, y se incluían las 5 nuevas en el grupo.

Las terneras y vaquillonas de ambos grupos fueron manejadas en un sistema de pastoreo en franjas semanales de pradera de festuca y trébol rojo. La franja semanal de pastura fue ajustada en ambos grupos con el objetivo de mantener una asignación de forraje del 8 % (8 kg/100 kg de PV). Para ello, se controló la disponibilidad de forraje de la pastura en forma regular, mediante la técnica de doble muestreo (Haydock y Shaw, 1975; Tabla 1). El manejo sanitario de los animales fue realizado de acuerdo con los protocolos establecidos en el campo de recría (prueba intradérmica de tuberculina, extracción de sangre para prueba de brucelosis, vacunación contra brucelosis, carbunco y clostridiosis, desparasitación interna).

Tabla 1. Disponibilidad promedio de la pastura (kg MS/ha) en los potreros de ambos grupos (RA y CON).

Día experimental	Disponibilidad promedio
-27	2000
10	1244
31	1064
90	2212
117	2590
149	2859
169	2030

Día 0= RS 1, día 15= RS 2, día 36= RS 3, día 64= RS 4, día 91= RS 5, día 114= RS 6, día 127= RS 7, día 148= RS 8, día 181= RS 9, día 198= RS 10.

Determinaciones

Comportamiento social

Se estudió la respuesta comportamental de las terneras y vaquillonas a cada RS. Para ello, 2 días antes del RS, el mismo día y durante los 7 días posteriores a cada RS se registraron todas las interacciones agonistas físicas (agresivas: cabezazos, empujones) y no físicas (amenazas) así como aquellas afiliativas (lamidos, olfateos, rascado, monta). Se registró por observación visual directa mediante un muestreo continuo de todos los animales durante las últimas 2 a 4 h de luz del día por 2 observadores entrenados. Para esto los animales fueron identificados con números grandes y legibles de manera de facilitar la visualización de los mismos a la distancia. Los registros se realizaron en planillas indicando qué vaquillona realizaba la acción y hacia cual iba dirigida la misma. Para facilitar el registro de las interacciones, en forma previa al inicio de las observaciones se colocaba un hilo de alambrado eléctrico en la franja de pastoreo de manera de limitar el traslado de los animales.

A su vez, a partir de las interacciones agonistas registradas se determinó el rango social de cada vaquillona en ambos grupos al inicio del experimento, en cada RS y al momento de la estabilización del grupo (7 días luego de cada RS). Para determinar el rango social de cada vaquillona, se utilizó la ecuación del índice de desplazamiento (ID) descripta por Galindo y Broom (2000):

$$ID = \frac{\text{n}^\circ \text{ de veces que ejerce interacción agonista a otras}}{\text{n}^\circ \text{ de veces que ejerce interacción agonista} + \text{n}^\circ \text{ de veces que recibe interacción agonista}}$$

Comportamiento ingestivo y postural

El patrón de comportamiento ingestivo y postural se registró mediante observación visual directa a través de un muestreo tipo scan sampling (Altmann, 1974) en todos los animales, cada 10 min durante 8-9 h el día anterior y siguiente a cada RS por dos observadores entrenados. El horario de los registros fue modificándose a lo largo del experimento de acuerdo a las horas de salida y puesta del sol, realizándose entre las 07.00 y 08.00 y entre las 18.00 y 20.00 h. Las actividades que se registraron fueron: come (con la cabeza en la pastura levantando pasto, parada o echada masticando pasto), rumia (masticación de rumia, tanto si se encontraba parada como echada), parada (con los 4 miembros apoyados en estación, sin estar caminando,

rumiando, o comiendo) y echada (decúbito esternal o lateral, sin estar rumiando o comiendo). Los observadores fueron entrenados para la identificación de las diferentes actividades antes del inicio de los registros.

Desarrollo corporal y reproductivo

Se registró el PV, la AC y la CC cada 21 días (luego del RS). Para ello, los 2 grupos fueron trasladados a las mangas, por separado para evitar cualquier contacto entre ellos, siempre en el mismo horario (entre las 07:00 y las 10:00 am). El PV se determinó mediante una balanza electrónica portátil, mientras que la tasa de ganancia diaria de PV (GDPV; kg/d) se calculó como la diferencia de peso dividida los días entre registros de peso. La CC se determinó en forma visual subjetiva, mediante una escala adaptada para vaquillonas lecheras, en la cual se le asigna a cada animal un valor entre 1 (emaciada) y 5 (obesa; Heinrichs y Lammers, 1998). Por su parte, la AC se registró mediante una regla calibrada, que fue colocada junto a las patas delanteras, con el animal parado sobre una superficie bien nivelada (Heinrichs y Lammers, 1998).

A partir del momento en que las vaquillonas alcanzaron entre los 180 y 220 kg de PV (Sejrsen y Purup, 1997), se colocaron parches en la grupa para la detección de celo (EstroTECT- Heat Detector, Minnesota, EEUU), cambiando los mismos cada 14 días. El control de los parches en ambos grupos se realizaba diariamente, anotando los animales que presentaban el parche despintado como señal de celo. Las variables determinadas a partir de dichos registros fueron los días al primer celo detectado (días del experimento) y el porcentaje de vaquillonas que manifestaron celo hasta ese momento (celo acumulado). En ambas variables se consideró que las vaquillonas presentaran más de un celo para confirmar el inicio de la ciclicidad.

Metabolismo energético y proteico e indicadores de estrés

Se determinaron las concentraciones sanguíneas de hormonas (insulina, IGF-1 y leptina) y metabolitos (glucosa, AGNE, BHB, albúmina, PPT, urea y colesterol) en muestras de sangre colectadas cada 21 días (1 o 2 días luego de cada RS) realizadas en forma conjunta con las mediciones del desarrollo corporal. Las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción de la vena coccígea con vacutainer, entre las 07:00 y 10:00 am, y eran depositadas en 2 tubos por cada vaca: tubo seco (para determinación de hormonas y metabolitos) y tubo con fluoruro de sodio (para determinación de glucosa). Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante 2 a 4 h, y luego se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min, y el suero y plasma resultante se conservó a -20 °C hasta su análisis. Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal de la Facultad de Veterinaria. Las concentraciones de

insulina e IGF-1 se determinaron mediante análisis inmunorradiométrico (IRMA; DIASource ImmunoAssays S.A., Louvain-laNeuve, Bélgica) en los RS 1, 3, 4, 5, 7 y 9, y las concentraciones de leptina mediante radioinmunoensayo (RIA; Cisbio Bioassays, Codolet, Francia) en los RS 1, 3, 5, 7 y 9. La sensibilidad del ensayo de la insulina fue de 0,42 μ UI/mL, y el CV intraensayo fue 10,2 y 5,5%, para controles bajos y altos respectivamente. La sensibilidad del ensayo de IGF-1 fue de 0,4 ng/mL, y los CV intraensayo fueron de 6,6 y 6,2%, para los controles bajos y altos, respectivamente. La sensibilidad del ensayo de la leptina fue de 1,46 ng/mL y los CV intraensayo fueron 13,8 y 7,5%, para controles bajos y altos, respectivamente. Las concentraciones de los metabolitos se determinaron mediante espectrofotometría (Espectrofotómetro A 25, BioSystem S.A., Barcelona, España) utilizando kits comerciales (BioSystem S.A., Barcelona, España).

Análisis estadístico

Los datos se analizaron en un diseño completamente al azar, mediante el software SAS (SAS University Edition, Cary, Carolina del Norte, EEUU), siendo la vaquillona considerada como la unidad experimental. Los parámetros de desarrollo corporal, metabolitos y el celo acumulado se analizaron mediante un modelo lineal mixto para medidas repetidas usando el procedimiento MIXED, mientras que las concentraciones de hormonas, el patrón de comportamiento ingestivo y las frecuencias de interacciones sociales (interacciones agonistas, interacciones afiliativas, relación interacciones agonistas/totales) se analizaron mediante el procedimiento GLIMMIX. A su vez, se determinó la relación albúmina/globulina en cada RS.

El modelo incluyó como efectos fijos el grupo (RA vs CON), el tiempo (RS; medida repetida) y su interacción, mientras que el establecimiento de origen de cada ternera y el animal fueron considerado como efectos aleatorios. Se incluyeron como covariables el PV inicial y la concentración de hormonas y metabolitos basales (analizadas al día 0).

La edad al primer celo detectado se analizó mediante el procedimiento LIFETEST, mediante los test de igualdad sobre los estratos Log-Rank, Wilcoxon, -2Log (LR).

Para el análisis del patrón de comportamiento ingestivo la frecuencia de cada comportamiento se calculó como la relación entre el número de veces que se observó que cada vaquilla realizaba cada actividad y el número total de registros por día ($n = 54$ o 60). Las horas del registro se agruparon en 2 periodos (HS), con el fin de determinar las diferencias a lo largo del día entre grupos: AM (primeras 5 horas del registro conductual) y PM (últimas 4 o 5 horas del registro conductual). El modelo incluyó como efectos fijos el grupo (RA vs

CON), el RS (medida repetida), el período (HS) y su interacción, mientras que el establecimiento de origen de cada ternera y el animal fueron incluidos como efectos aleatorios.

Posteriormente, con el objetivo de determinar el efecto de los RS frecuentes de acuerdo con el rango social, las vaquillonas se categorizaron en tres grupos en base a los ID calculados en cada RS (Fernández et al., 2007; Miranda-de la Lama et al., 2013). Para ello, se caracterizó la variable y observaciones mediante los procedimientos MEANS y FREQ con los ID al día 7, según las medias y sus frecuencias por cada RS, conformándose de esa manera tres categorías (K): K1 referida a las vaquillonas más subordinadas (de 0 a 0,11 de ID), K2 aquellas de rango medio (de 0,12 a 0,84 de ID) y K3 para las vaquillonas más dominantes (de 0,85 a 1 de ID). La cantidad de vaquillonas por K varió a lo largo de los RS, registrándose una media de 3 vaquillonas en K1 (rango = 1 - 6), 4 en K2 (rango = 1 - 8) y 4 en K3 (rango = 1 - 8). Los datos de desarrollo corporal, metabolitos y hormonas del grupo RA fueron analizados mediante los procedimientos MIXED o GLIMMIX; considerando la K, el RS y la interacción de ambos como efectos fijos, y el establecimiento de origen de cada ternera y el animal como aleatorios.

Para todos los modelos, se utilizó la estructura de co-varianza AR (1) para periodos de tiempo constantes entre mediciones o SP (pow) para periodos no constantes. El procedimiento de Kenward–Rogers se utilizó para ajustar los grados de libertad. Se consideraron diferencias significativas los valores de $P \leq 0,05$, y tendencias aquellos entre $0,05 > P \leq 0,1$.

RESULTADOS

Desarrollo corporal y reproductivo

El PV y la GDP variaron a medida que progresaron los RS ($P < 0,01$), pero no existió efecto del grupo, ni interacción entre el grupo y el RS en dichas variables (Tabla 2). Sin embargo, hubo interacción entre el grupo y el número de RS en la AC y la CC ($P < 0,01$; Tabla 2). Las vaquillonas CON presentaron mayor AC en los RS 9 y 10, y mayor CC en los RS 4 y 5 ($P = 0,01$; Figuras 1A y 1B) que las vaquillonas RA. A su vez, las vaquillonas CON tendieron a tener mayor AC de que las vaquillonas RA en el RS 8 ($P = 0,06$).

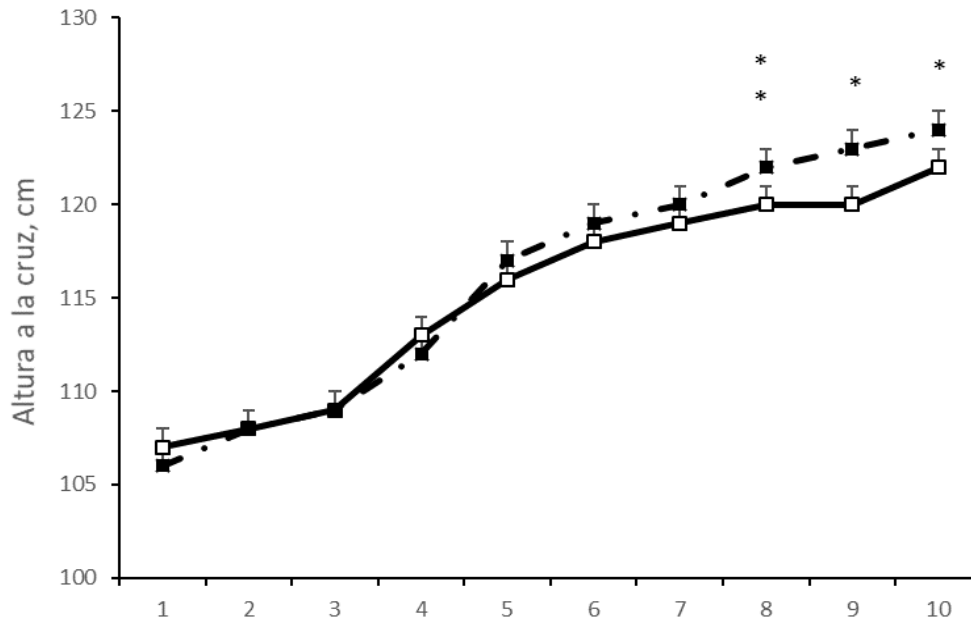
Las vaquillonas CON entraron en celo antes (Figura 2), y presentaron mayor índice de celo acumulado que las vaquillonas RA ($P < 0,01$; Tabla 2).

Tabla 2. Parámetros de desarrollo corporal (medias) y respuestas reproductivas de vaquillonas lecheras que se reagruparon con 5 vaquillonas nuevas cada 21 días (RA; N = 14), o se mantuvieron en un grupo estable (Control, CON; N = 14) durante 205 días. Las mediciones fueron realizadas cada 21 días, después de cada reagrupamiento social (RS). Total = 10 SR.

	Grupo			<i>P</i>		
	CON	RA	EEM	Grupo	RS	grupo por RS
PV, kg	266,7	259,9	5,4	0,16	<0,01	0,52
GDP, kg/d	0,82	0,79	0,02	0,34	<0,01	0,08
Altura cruz, cm	115,9	115,4	1,8	0,30	<0,01	0,01
CC	3,4	3,3	0,13	0,13	<0,01	0,01
Primer estro, d	93 ± 9	126 ± 14	-	0,05	-	-
Índice de celo acumulado	0,69	0,48	0,05	0,01	-	-

PV: peso vivo; GDP: ganancia diaria de peso; CC: condición corporal. Day 0= primer RS.

A



B

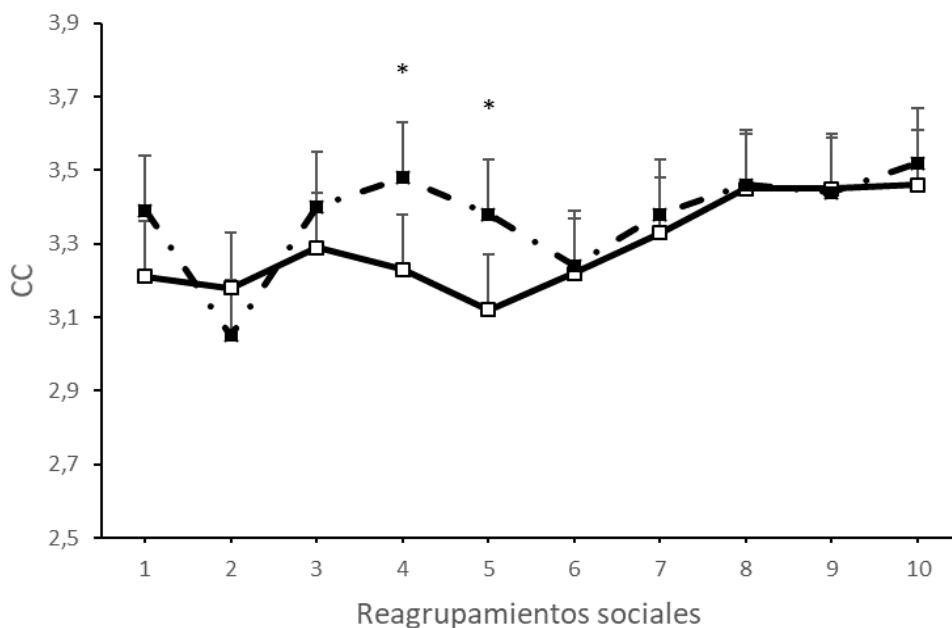


Figura 1. Altura de la cruz (A) y condición corporal (CC; B) en vaquillonas lecheras que se reagruparon con 5 vaquillas nuevas cada 21 días (RA; N = 14; líneas continuas) o mantenidas en un grupo estable (Control, CON; N = 14; líneas punteadas) durante 205 días, según el número de RS (reagrupamiento social; en el eje x). * $P \leq 0,05$; ** $0,05 > P \leq 0,1$. Las barras de error representan SEM.

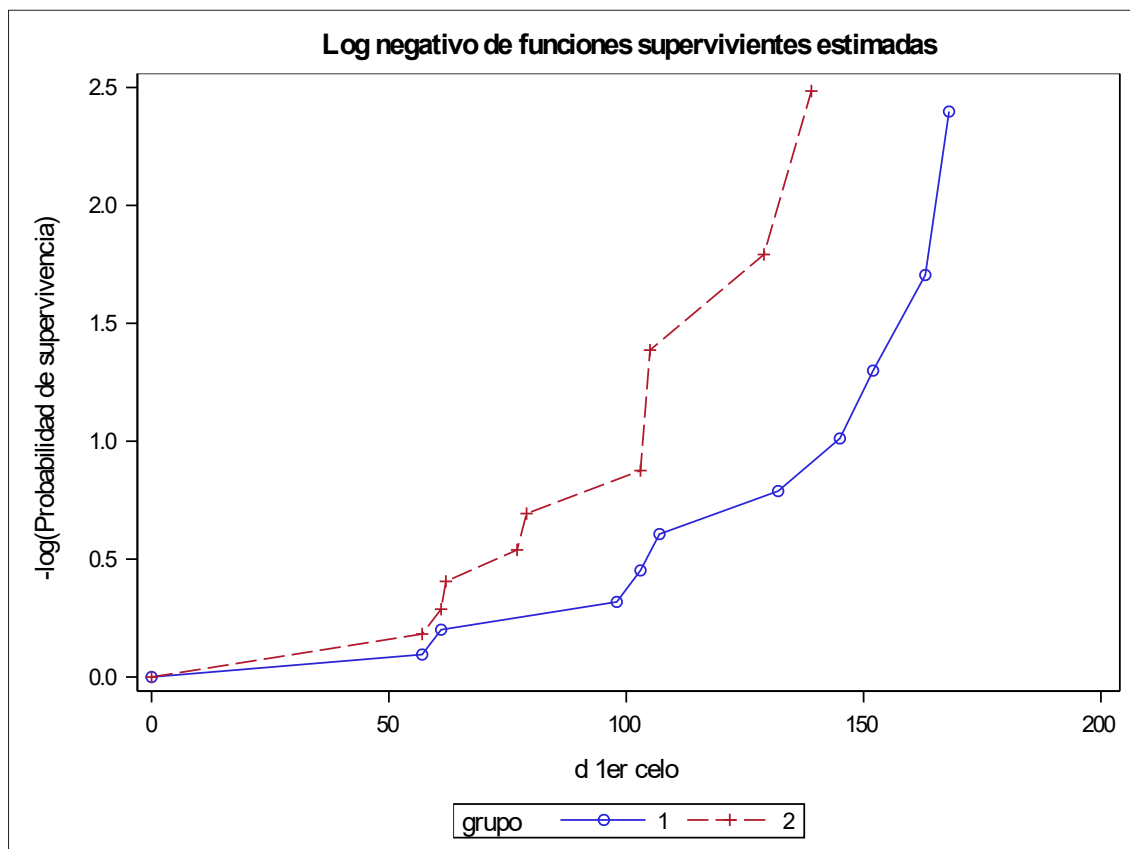


Figura 2. Primer celo detectado en vaquillonas lecheras que se reagruparon con 5 vaquillonas nuevas cada 21 días (RA; N = 14; línea azul continua) o mantenidas en un grupo estable (Control, CON; N = 14; línea rosada punteada) durante 205 días, según los días desde iniciado el experimento (Día 0). Existió un efecto grupo (P <0,05).

Hormonas metabólicas y metabolitos

Las concentraciones de IGF-1 y de glucosa fueron mayores en las vaquillonas CON que en las RA (P <0,01 y P = 0,04, respectivamente; Tabla 3). También se encontró una interacción entre grupo y RS en la glucemia (P = 0,05), la que tendió a ser mayor en el RS 3 (P = 0,09), y fue mayor en RS 6 en las vaquillonas CON que en las RA (P <0,01; Figura 3A). Sin embargo, las vaquillonas RA presentaron mayores concentraciones de leptina a lo largo del experimento que las vaquillonas CON (P < 0,05; Tabla 3). A su vez, las concentraciones de leptina de las vaquillonas RA fueron mayores en los RS 1 ($7,7 \pm 1,1$ ng/mL vs $3,9 \pm 0,9$ ng/mL; P = 0,01) y 5 ($9,2 \pm 1,3$ ng/mL vs $4,3 \pm 0,8$ ng/mL; P <0,01) y tendieron a ser mayores en el 3 ($7,8 \pm 1,2$ ng/mL vs $4,8 \pm 1,1$ ng/mL; P = 0,08) que en las vaquillonas CON. La concentración de insulina no se vio afectada por el grupo, pero hubo una interacción entre grupo y RS (P <0,01; Tabla 3): las vaquillonas RA presentaron mayores concentraciones de insulina que las CON en el RS 5 ($5,02 \pm 0,7$ μ UI/mL vs $3,2 \pm 0,6$ μ UI/mL; P = 0,05) y tendió a ser mayor en el RS 9 ($7,1 \pm 0,9$ μ UI/mL vs $5,4 \pm 0,8$ μ UI/mL; P = 0,07).

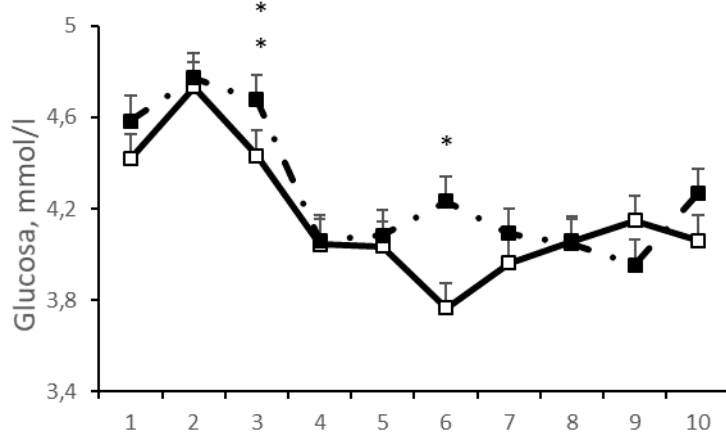
Las concentraciones de albúmina, la relación albúmina/globulina y las concentraciones de urea, fueron mayores en las vaquillonas CON que en las RA ($P < 0,01$; Tabla 3), sin interacción entre grupo y RS en ninguna de dichas variables. Además, hubo una interacción entre grupo y RS en las concentraciones de urea ($P < 0,01$): las vaquillonas CON presentaron mayores concentraciones de urea que las vaquillonas RA en los RS 3, 4, 5, 8, 9 y 10 ($P < 0,01$ para todas; Figura 3B). En contraste, las concentraciones de AGNE fueron mayores en las vaquillonas RA que en las CON ($P = 0,04$; Tabla 3), y también existió una interacción entre grupo y RS ($P < 0,01$). La concentración de AGNE fue mayor en las vaquillonas RA que en las CON en los RS 3, 5 y 7 (Figura 3C). Las PPT y el colesterol cambiaron únicamente en relación con los RS, mientras que no se observaron efectos significativos del grupo, del RS ni hubo interacción entre grupo y RS en las concentraciones de BHB ($P > 0.05$; Tabla 3).

Tabla 3. Concentración de hormonas y metabolitos de vaquillonas lecheras que se reagruparon con 5 vaquillonas nuevas cada 21 días (RA; N = 14), o se mantuvieron en un grupo estable (Control, CON; N = 14) durante 205 días. Las mediciones fueron realizadas cada 21 días, después de cada reagrupamiento social (RS). Total = 10 SR.

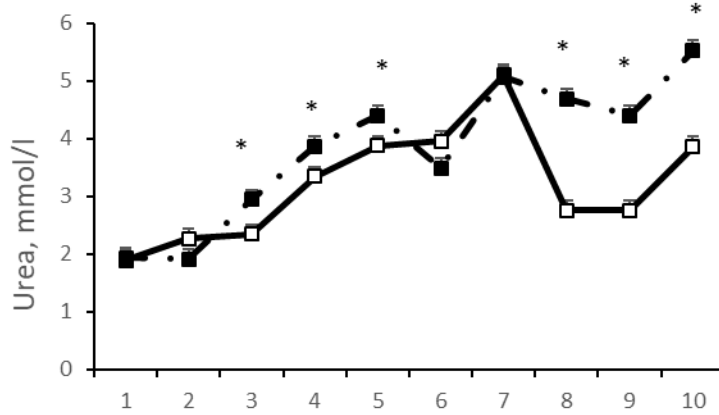
	Grupo			<i>P</i>		
	CON	RA	EEM	grupo	RS	grupo por RS
Insulina, μ IU/mL	5,40	5,50	0,50	ns	<0,01	0,05
IGF-1, ng/mL	171,3	120,0	10,1	<0,01	<0,01	ns
Leptina, ng/mL	4,9	7,3	0,7	0,02	0,03	<0,01
Glucosa, mmol/L	4,30	4,20	0,07	0,04	<0,01	0,05
NEFA, mmol/L	0,30	0,35	0,04	0,04	<0,01	<0,01
BHB, mmol/L	0,30	0,40	0,03	ns	ns	ns
Colesterol, mmol/L	2,60	2,60	0,05	ns	<0,01	ns
Proteínas totales, g/L	67,1	64,4	0,60	ns	<0,01	ns
Albúmina, g/L	30,0	28,6	0,60	0,01	<0,01	ns
Albúmina/globulina	0,82	0,77	0,03	0,05	<0,01	ns
Urea, mmol/L	3,80	3,20	0,06	<0,01	<0,01	<0,01

IGF-1: factor de crecimiento insulínico de tipo 1; NEFA: ácidos grasos no esterificados, BHB: beta-hidroxibutirato. ns: $P > 0.05$.

A



B



C

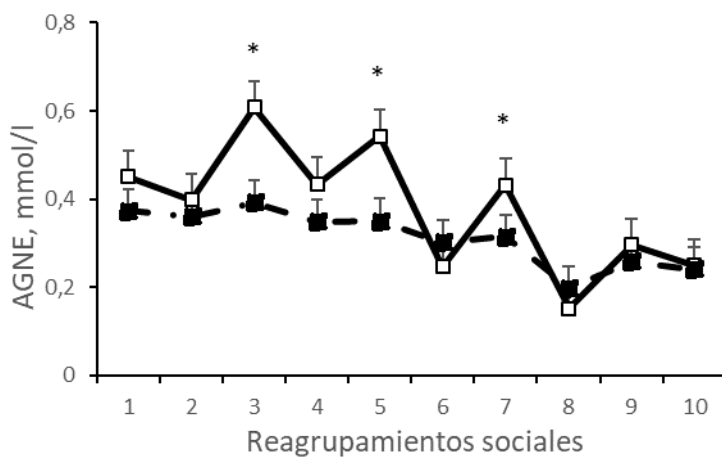


Figura 3. Concentraciones de glucosa (A), concentraciones de urea (B) y concentraciones de AGNE (ácidos grasos no esterificados; C) en vaquillonas lecheras que se reagruparon con 5 vaquillonas nuevas cada 21 días (RA; N = 14; líneas continuas) o mantenidas en un grupo estable (Control, CON; N = 14; líneas punteadas) durante 205 días, según el número de RS (reagrupamiento)

social; en el eje x). Hubo un efecto de grupo en las concentraciones de glucosa, urea y NEFA ($P < 0,05$). * $P \leq 0,05$; ** $0,05 > P \leq 0,1$. Las barras de error representan SEM.

Comportamiento ingestivo y postural

Las vaquillonas RA estuvieron mayor proporción del tiempo comiendo que las vaquillonas CON ($P < 0,01$), y también existió una interacción entre grupo y RS ($P < 0,01$; Tabla 4). El tiempo comiendo en las vaquillonas RA fue mayor en los RS 6, 7, 8 y 10 ($P < 0,01$), mientras que en los RS 1, 4 y 9 las vaquillonas CON estuvieron mayor proporción del tiempo comiendo que las vaquillonas RA (Figura 4A1). También existió una interacción triple, entre grupo, RS y HS ($P < 0,01$): durante el período AM las vaquillonas CON tendieron a comer durante más tiempo en el RS 4 y pasaron más tiempo comiendo en los RS 7 a 9, pero tendieron a comer durante menos tiempo en el RS 5, y pasaron menos tiempo comiendo ($P < 0,01$) en los RS 6 y 10, que las vaquillonas RA (Figura 4A2). Durante el periodo PM, las vaquillonas CON pasaron más tiempo comiendo en los RS 1, 3, 4 y 9, y comieron durante menos tiempo en los RS 6, 7, 8 y 10 que las vaquillonas RA (Figura 4A3).

Las vaquillonas CON estuvieron mayor proporción del tiempo rumiando que las vaquillonas RA ($P < 0,01$) a lo largo del experimento, y también existió una interacción entre grupo y RS ($P < 0,01$; Tabla 4). Se observó que las vaquillonas CON rumiaron más tiempo en los RS 1, 5, 6 y 8, y menos tiempo en los RS 3 y 9 que las vaquillonas RA (Figura 4B1). A su vez, se encontró una interacción triple entre grupo, RS y HS ($P < 0,01$): durante el periodo AM, las vaquillonas CON estuvieron más tiempo rumiando en el RS 1 pero menos tiempo en los RS 3 y 7 que las vaquillonas RA (Figura 4B2). Por su parte, durante el periodo PM, las vaquillonas CON estuvieron más tiempo rumiando en los RS 1, 5 y 8, pero menos tiempo rumiando en los RS 3 y 9 que las vaquillonas RA (Figura 4B3).

Tabla 4. Frecuencia de actividades de comportamiento ingestivo y postural de vaquillonas lecheras que se reagruparon con 5 vaquillonas nuevas cada 21 días (RA; N = 14), o se mantuvieron en un grupo estable (Control, CON; N = 14) durante 205 días. Los comportamientos se registraron mediante un scan sampling cada 10 min durante 9 a 10 h (8 am- 6 pm) el día después de cada reagrupamiento social (RS). Total = 10 SR.

	Grupo			<i>P</i>		
	CON	RA	EEM	Grupo	RS	grupo por RS
Comiendo	0,33	0,45	0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Rumiando	0,24	0,21	0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Echada	0,14	0,12	0,01	0,03	<0,01	<0,01
Parada	0,09	0,08	0,01	ns	<0,01	<0,01

ns: $P > 0.05$.

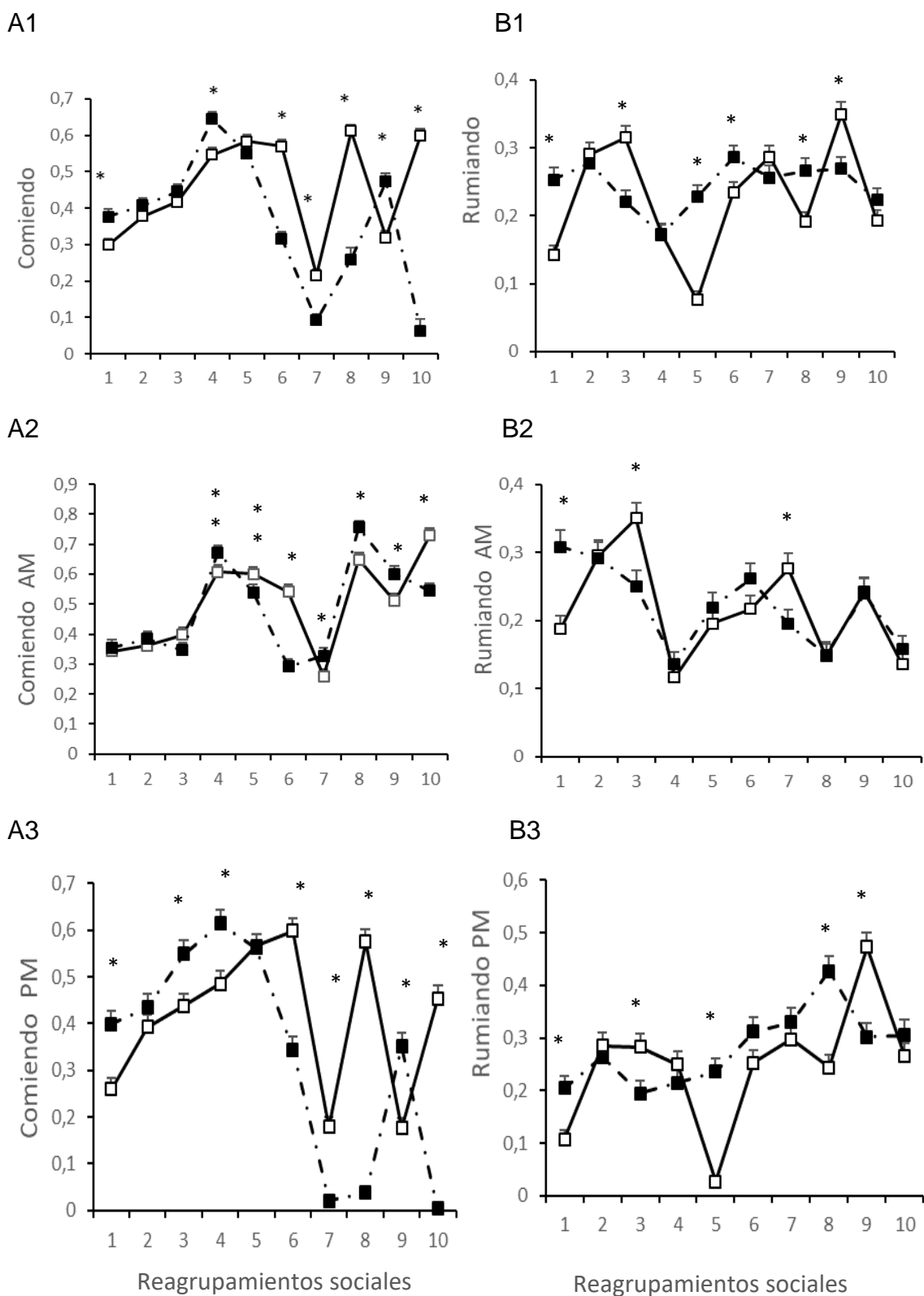


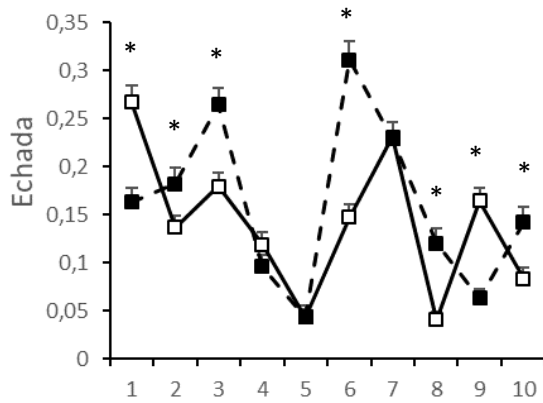
Figura 4. Comportamiento ingestivo (proporción de tiempo) en vaquillonas lecheras que fueron reagrupadas con 5 vaquillonas nuevas cada 21 días (RA; N = 14; líneas continuas) o mantenidas en un grupo estable (Control, CON; N =

14; líneas de puntos) durante 205 días. Panel A: tiempo total comiendo (1) y tiempo comiendo durante las primeras 5 (2) y las últimas 4-5 horas (3) del muestreo de comportamiento. Panel B: tiempo total de rumia (1) y tiempo de rumia durante las primeras 5 (2) y las últimas 4-5 horas (3) de muestreo de comportamiento. En el eje x: número de reagrupamiento social (RS; total = 10 SR). La actividad de comer y rumiar tuvo efectos de grupo, SR y grupos * RS ($P < 0,05$). * $P \leq 0,05$; ** $0,05 > P \leq 0,1$. Las barras de error representan SEM.

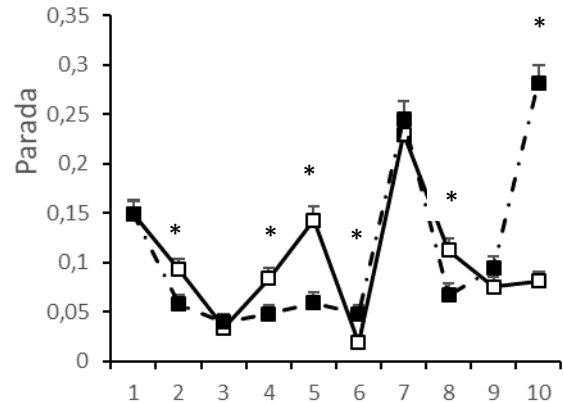
Las vaquillonas CON estuvieron mayor proporción del tiempo echadas que las vaquillonas RA ($P = 0,03$), y hubo una interacción entre grupo y RS ($P < 0,01$; Tabla 4). Las vaquillonas CON estuvieron más tiempo echadas en los RS 2, 3, 6, 8 y 10, pero menos tiempo en los RS 1 y 9 que las vaquillonas RA (Figura 5A1). También existió una interacción triple entre grupo RS y HS ($P < 0,01$): durante el periodo AM, las vaquillonas CON estuvieron más tiempo echadas en los RS 2, 3, 5, 6 y 8 y tendieron a pasar menos tiempo echadas en los RS 1 y 7, respectivamente que las vaquillonas RA (Figura 5A2). Durante el periodo PM, el tiempo que pasaron echadas en los RS 6 a 8 y 10 fue mayor y en los RS 1, 4 y 9 fue menor en las vaquillonas CON que en las RA (Figura 5A3).

La proporción del tiempo en que las vaquillonas se mantuvieron paradas no se vio afectada por el grupo, pero hubo una interacción entre grupo y RS ($P < 0,01$; Tabla 4): las vaquillonas RA se observaron de pie más tiempo en los RS 2, 4, 5 y 8, pero menos tiempo en los RS 6 y 10, que las vaquillonas CON (Figura 5B1). Además, hubo una triple interacción entre grupo, RS y HS en la proporción del tiempo paradas ($P < 0,01$). Durante el periodo AM, las vaquillonas RA estuvieron más tiempo de pie en los RS 2, 4, 5 y 8, pero menos tiempo en los RS 7 y 10 que las vaquillonas CON (Figura 5B2), mientras que en el periodo PM, las vaquillonas RA estuvieron más tiempo de pie solo en RS 5 pero menos tiempo en RS 6, 8 y 10 que las vaquillonas CON (Figura 5B3).

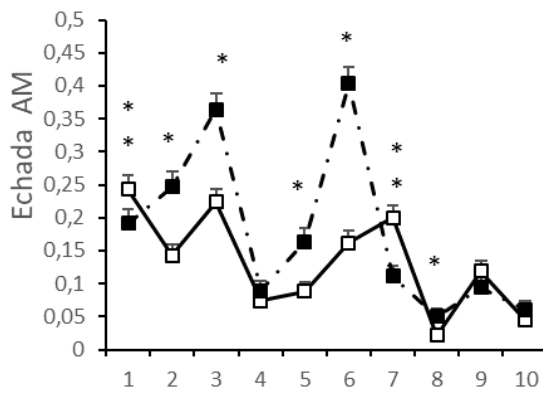
A1



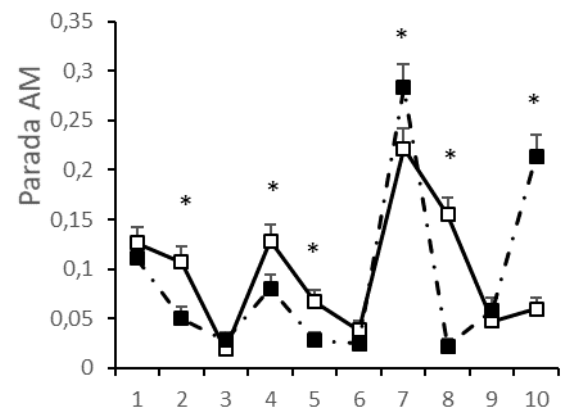
B1



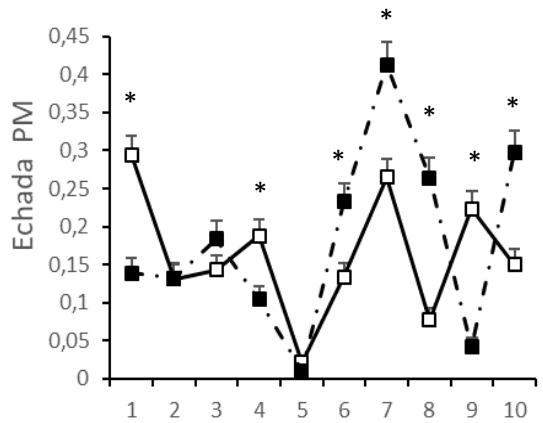
A2



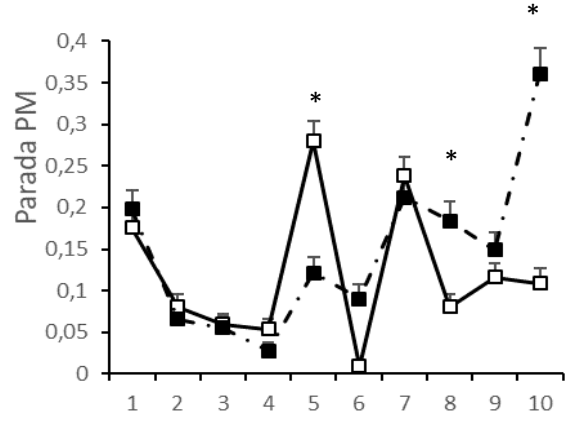
B2



A3



B3



Reagrupamientos sociales

Reagrupamientos sociales

Figura 5. Comportamiento postural (proporción de tiempo) en vaquillonas lecheras que fueron reagrupadas con 5 vaquillonas nuevas cada 21 días (RA; N = 14; líneas continuas) o mantenidas en un grupo estable (Control, CON; N = 14; líneas de puntos) durante 205 días. Panel A: tiempo total echadas (1) y tiempo echadas durante las primeras 5 (2) y las últimas 4-5 horas (3) del

muestreo de comportamiento. Panel B: tiempo total de pie (1) y tiempo de pie durante las primeras 5 (2) y las últimas 4-5 horas (3) del muestreo de comportamiento. En el eje x: número de reagrupamiento social (RS; total = 10 SR). La actividad echada tuvo un efecto de grupo, y ambas actividades tuvieron efectos RS y grupo * RS ($P < 0,05$). * $P \leq 0,05$; ** $0,05 > P \leq 0,1$. Las barras de error representan SEM.

Comportamiento social

Las vaquillonas RA realizaron mayor cantidad de interacciones agonistas que las CON a lo largo de todo el experimento ($P = 0,03$; Tabla 5). También existió interacción entre grupo y RS ($P < 0,01$; Figura 6A): las RA realizaron mayor cantidad de interacciones agonistas en los RS 3, 5 y 7, mientras que las CON lo hicieron en los RS 4, 8 y 10. Analizando las interacciones agonistas en relación con el día del RS (día del RS vs 7 días posteriores al RS), las vaquillonas RA también realizaron más cantidad de interacciones agonistas el día del RS que las vaquillonas CON (Tabla 5). Por el contrario, 7 días luego del RS no hubo diferencia significativa (Tabla 5). Dentro del mismo grupo, las vaquillonas RA realizaron más interacciones agonistas el día 0 que el día 7 en el período de registro ($2,6 \pm 0,8$ vs $1,8 \pm 0,6$; $P < 0,01$). Sin embargo, en las vaquillonas CON no existieron diferencias significativas en la cantidad de interacciones agonistas entre los días de determinación ($1,8$ vs $1,8 \pm 0,6$; $P > 0,05$).

Las vaquillonas CON realizaron más interacciones afiliativas a lo largo de todo el experimento ($P < 0,01$; Tabla 5) y también existió una interacción entre grupo y RS ($P < 0,01$; Figura 6B). El día del RS no hubo diferencia significativa entre grupos (Tabla 5), pero a los 7 días del RS las vaquillonas CON realizaron mayor cantidad de interacciones afiliativas que las RA (Tabla 5).

En cuanto a las interacciones totales (agonistas más afiliativas), no existieron diferencias entre grupos a lo largo del experimento (Tabla 5), pero si existió una interacción entre grupo y RS ($P < 0,01$; Figura 6C). El día del RS las vaquillonas RA realizaron más cantidad de interacciones que las vaquillonas CON (Tabla 5). Por el contrario, a los 7 días las vaquillonas CON realizaron más interacciones totales que las RA (Tabla 5). Dentro del mismo grupo, las RA realizaron más interacciones totales el día del RS que a los 7 días ($3,8 \pm 1,1$ vs $2,5 \pm 0,7$; $P < 0,01$). Por otro lado, las vaquillonas CON realizaron más interacciones totales a los 7 días del RS que el día del RS ($3,5 \pm 1,0$ vs $3,0 \pm 0,9$; $P = 0,01$).

Las interacciones totales entre los “animales fijos” y los “volantes móviles” del grupo RA, fueron mayores el día del RS que a los 7 días posteriores al mismo ($1,3 \pm 0,2$ vs $0,5 \pm 0,1$; $P < 0,01$). No existieron diferencias en las interacciones agonistas/totales ($0,58$ vs $0,55 \pm 0,5$; $P > 0,05$), ni en la relación entre las interacciones agonistas en las que participa/totales que participa entre grupos ($0,67$ vs $0,64 \pm 0,5$; $P > 0,05$) ni entre RS ($P > 0,05$).

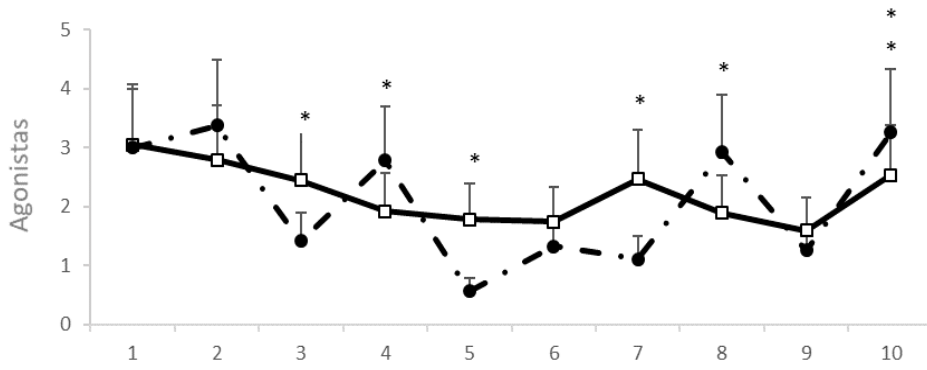
No se encontraron diferencias en ninguna de las variables de desarrollo corporal de acuerdo al rango social (K1, K2 y K3) a lo largo del experimento, ni interacción entre K y RS ($P > 0,05$; datos no presentados). Las concentraciones de glucosa, colesterol, urea, PPT y AGNE tampoco se vieron afectadas por el rango social ($P > 0,05$; datos no presentados). Sin embargo, las concentraciones de BHB presentaron una tendencia en la interacción entre K y RS ($P = 0,09$). Por su parte, las concentraciones de albúmina presentaron una tendencia a variar de acuerdo al K ($P = 0,06$). En relación a las hormonas, únicamente se encontró efecto de K en las concentraciones de insulina, que fueron mayores en las vaquillonas K3 que en las K1 ($5,8 \pm 0,9 \mu\text{UI/mL}$ vs $3,6 \pm 0,7 \mu\text{UI/mL}$, respectivamente; $P = 0,01$).

Tabla 5. Cantidad de interacciones sociales que realizaron vaquillonas lecheras que se reagruparon con 5 vaquillonas nuevas cada 21 días (RG; $N = 14$), o se mantuvieron en un grupo estable (Control, CON; $N = 14$) durante 205 días. Las mediciones fueron realizadas cada 21 días, el día del reagrupamiento social (día 0; RS) y 7 días después del mismo. Total = 10 SR.

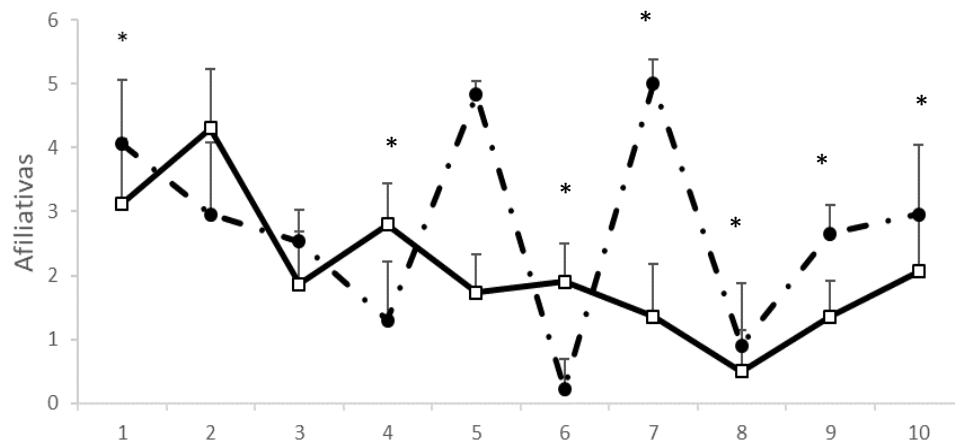
	Día	Grupo			P	
		RA	CON	EEM	Grupo	Grupo por día
Agonistas	-	2,2	1,8	0,7	0,03	< 0,01
	0	2,6	1,8	0,6	-	< 0,01
	7	1,8	1,8	0,6	-	ns
Afiliativas	-	2,1	2,7	0,6	< 0,01	< 0,01
	0	2,1	1,5	0,6	-	ns
	7	2,1	4	0,7	-	< 0,01
Totales	-	3,1	3,2	0,9	ns	< 0,01
	0	$3,8 \pm 1,2$	$3,0 \pm 0,9$	-	-	< 0,01
	7	$2,5 \pm 0,7$	$3,5 \pm 1,0$	-	-	< 0,01

ns: $P > 0.05$.

A



B



C

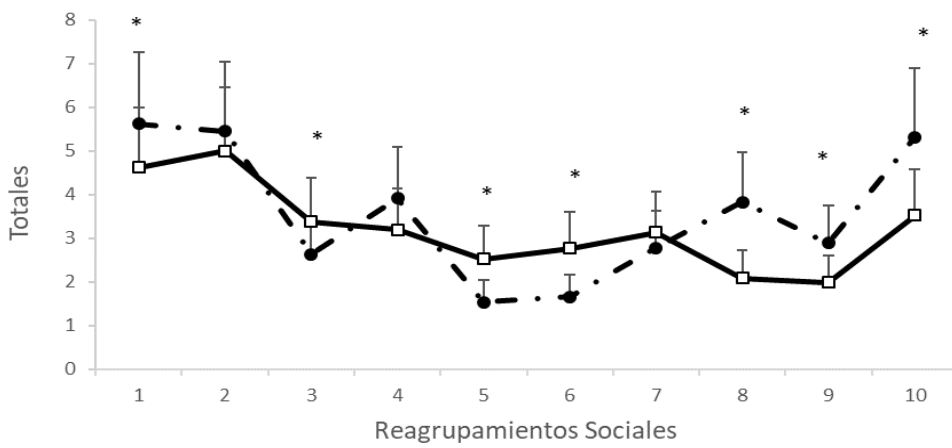


Figura 6. Cantidad de interacciones agonistas (A), afiliativas (B) y totales (agonistas + afiliativas; C) en vaquillonas lecheras que se reagruparon con 5 vaquillonas nuevas cada 21 días (RA; N = 14; líneas continuas) o mantenidas en un grupo estable (Control, CON; N = 14; líneas punteadas) durante 205 días, según el número de RS (reagrupamiento social; en el eje x). Hubo un efecto de grupo en las interacciones agonistas y afiliativas ($P < 0,05$). * $P \leq 0,05$; ** $0,05 > P \leq 0,1$. Las barras de error representan SEM.

DISCUSIÓN

De acuerdo con la bibliografía consultada, este es el primer estudio que determinó que los RS frecuentes afectan negativamente el desarrollo reproductivo de las hembras. A su vez, los RS frecuentes de las vaquillonas lecheras afectaron el comportamiento y el metabolismo energético, lo que posiblemente determinó un retraso en el desarrollo corporal y en el comienzo de la ciclicidad. En efecto, confirmando la hipótesis inicial, los RS frecuentes determinaron un retraso en el primer estro de más de un mes en comparación con las vaquillonas no reagrupadas. En el mismo sentido, Fiol et al. (2017) reportaron que otro factor social, como la dominancia entre dos individuos, modificó el desarrollo folicular y la edad a la pubertad en vaquillonas. Por otra parte, en el presente estudio, el primer estro en las vaquillonas CON coincidió con el período en el que estos animales tuvieron mayor CC, lo que concuerda con estudios previos en vaquillonas y vacas que reportan que la ciclicidad se relaciona positivamente con la evolución de la CC (Mialon et al., 2001). Debido a las condiciones de manejo del campo de recría comercial, no fue posible evaluar el efecto del retardo en el inicio de los celos sobre la edad o la tasa de concepción al primer servicio de las vaquillonas. En este sentido, considerando la relación positiva entre el número de estros anteriores al primer servicio y la fertilidad del mismo (Byerley et al., 1987), se esperaría una mayor edad al primer servicio y una menor tasa de concepción en las vaquillonas RA en que en las vaquillonas CON, lo que debería ser confirmado experimentalmente.

Al igual que en estudios previos realizados en ovejas (Sevi et al., 2001) y novillos (Gupta et al., 2008), el PV y la GDP de las vaquillonas no se vieron afectados por los RS. Por el contrario, se encontraron diferencias en la CC y la AC entre ambos grupos de vaquillonas. En este sentido, la mayor CC y AC de las vaquillonas CON en comparación con las vaquillonas RA fueron registradas luego de realizados 4 y 9 RS, respectivamente, lo que sugiere que se necesitaría la exposición a varios RS para que los efectos de los mismos tengan impacto sobre las reservas corporales y el desarrollo esquelético en las vaquillonas. A su vez, la AC en el último RS en las vaquillonas RA (122 cm), momento en el cual los animales estarían en condiciones de ingresar al servicio, fue inferior al umbral mínimo de AC considerado óptimo para el primer servicio en animales de esta categoría (125 cm; Hoffman, 1997; Heinrichs y

Lammers, 1998). La necesidad de un número acumulado de RS antes de que se observen diferencias en la AC y en la CC, es consistente con el tiempo necesario para detectar cambios en dichas variables (Hoffman, 1997). Por lo tanto, de acuerdo con los resultados obtenidos, si bien las consecuencias negativas de los RS frecuentes sobre las reservas corporales y el desarrollo esquelético en vaquillonas en crecimiento podrían ser inmediatas, los efectos serían lo suficientemente fuertes como para visualizarse en los parámetros de desarrollo corporal cuando se realizan al menos cuatro RS.

En el presente estudio, las vaquillonas CON presentaron mayores concentraciones de IGF-1 y de glucosa que las vaquillonas RA a lo largo del estudio, lo cual se asoció con un primer estro más temprano y una mayor proporción de celo acumulado. En las vaquillonas, el desarrollo corporal y reproductivo están asociados con cambios en los parámetros metabólicos y endócrinos (Chelikani et al., 2009). De hecho, tanto la IGF-1 (Brickell et al., 2007) como la glucosa se han relacionado con varios rasgos reproductivos, como son la edad a la pubertad y al primer parto, la concepción al primer servicio y la fertilidad (Taylor et al., 2004; Chelikani et al., 2009). A su vez, considerando las concentraciones de AGNE encontradas en ambos grupos de vaquillonas, la movilización de reservas grasas fue mayor en las vaquillonas RA que en las CON. En este sentido, las vaquillonas RA probablemente depositaron menos tejido adiposo para compensar el estado energético más negativo (Adewuyi et al., 2005), reflejado por las menores concentraciones de glucosa e IGF-1, lo que finalmente se reflejó en una menor CC. Por tanto, los RS frecuentes determinaron un metabolismo energético más negativo asociado con un desarrollo esquelético alterado, mayor movilización de reservas corporales y un retraso en el inicio de la ciclicidad en las vaquillonas reagrupadas.

Los resultados relacionados a la concentración de leptina fueron contradictorios con los estudios que asocian positivamente la concentración de la misma con la concentración de otras hormonas metabólicas (insulina e IGF-1) y reproductivas (estradiol, LH), así como con una mayor CC (Amstalden et al., 2000; León et al., 2004; Sirotkin et al., 2018). En el presente estudio, las vaquillonas RA presentaron mayor concentración de leptina que las CON a lo largo del experimento y en la mayoría de los RS en los que esta hormona fue analizada. Sin embargo, las vaquillonas RA presentaron menor concentración de IGF-1 a lo largo del experimento y mayor concentración de insulina en algunos RS que las vaquillonas CON. Por otra parte, la CC de las vaquillonas RA fue menor en algunos RS, y presentaron un primer celo más tardío que las CON. En forma similar, Alamilla Rodríguez et al. (2017) reportaron menores concentraciones de leptina en terneras que presentaron mayores concentraciones de LH, mientras que Block et al. (2003) encontraron un aumento sostenido de las concentraciones de leptina en vaquillonas Holstein

con retraso en la aparición de la pubertad. A su vez, en varios estudios en bovinos y ovinos (Dyer et al., 1997; Iqbal et al., 2000; Zieba et al., 2005), se propuso que la respuesta del eje gonadotrópico a la leptina depende del balance energético y del estado metabólico de los animales. En el presente trabajo, las vaquillonas RS, que sufrieron una mayor alteración metabólica y energética, y un desarrollo reproductivo más tardío, presentaron mayores niveles de leptina, concordando con aquellos trabajos que reportan que las concentraciones de leptina *per se* no son un determinante del inicio de la pubertad y de los celos en las vaquillonas (Block et al., 2003).

Las diferencias observadas en el metabolismo energético entre ambos grupos de vaquillonas podrían indicar que la ingesta de alimento, la utilización de los nutrientes consumidos, o ambos, difirieron entre las vaquillonas reagrupadas y no reagrupadas. En condiciones de pastoreo, la ingesta de alimento está determinada en gran medida por el comportamiento ingestivo (Chilibroste et al., 2007). En este sentido, las vaquillonas RA comieron durante más tiempo, lo cual estuvo relacionado probablemente con la necesidad de cubrir las mayores demandas energéticas provocadas por el estrés social. Además, si bien las vaquillonas RA comieron durante más tiempo a lo largo del experimento, igualmente presentaron un metabolismo energético más negativo que las vaquillonas CON. Este hallazgo demuestra que un tiempo de consumo más prolongado no pudo compensar los mayores requisitos energéticos, o que la cosecha de pasto fue menos eficiente, y/o que el mayor tiempo de pastoreo también representó un costo para las vaquillonas RA (DeVries et al., 2004). Sin embargo, cuando los resultados se analizan de acuerdo con el número de RS, las vaquillonas RA pasaron menos tiempo comiendo durante el primer RS y más tiempo comiendo durante el último RS. En ese sentido, es posible especular que los cambios en el tiempo de consumo en las vaquillonas RA reflejan una adaptación conductual predictiva a los sucesivos cambios en su entorno social. En estudios anteriores no se demostraron efectos del RS en el tiempo total de consumo diario (von Keyserlingk et al., 2008; Shirmann et al., 2011), pero se reportó un efecto negativo a corto plazo sobre el tiempo de consumo en animales reagrupados (von Keyserlingk et al., 2008), y una disminución en la tasa de consumo en forma inmediata al RS (Shirmann et al., 2011). Esta aparente diferencia entre estudios podría estar relacionada con el momento y la duración en que se realizaron las observaciones visuales luego del RS, y a las características de las dietas, ya que en condiciones de pastoreo las vaquillonas podrían aumentar su tiempo de consumo más fácilmente debido al acceso a áreas con menor densidad de animales, disminuyendo de esa manera la competencia social. Cuando se analizan los resultados según el momento del día, las vaquillonas RA pasaron menos tiempo comiendo en el período PM durante el RS inicial que las vaquillonas CON. En este sentido, si bien el patrón de comportamiento social no fue registrado a lo largo de todo el día, se observó que las vaquillonas RA aumentaban la cantidad de

interacciones sociales durante la última parte del día. Por lo tanto, un menor tiempo de consumo en las vaquillonas RA durante el período PM podría relacionarse con un mayor tiempo dedicado a estabilizar la estructura social del grupo.

Los rumiantes muestran diferentes adaptaciones conductuales y metabólicas a los factores de estrés social (Keeling y Gonyou, 2001; Bøe y Færevik, 2003; Fiol et al., 2019). Las vaquillonas RA estuvieron menos tiempo rumiando y echadas que las vaquillonas CON, como se describió previamente en bovinos (Schirmann et al., 2011; Veissier et al., 2001) y ovinos (Sevi et al., 2001) reagrupados. De hecho, el tiempo de rumia se asocia positivamente con el tiempo de reposo, y se espera un menor tiempo de rumia cuando aumenta el tiempo de consumo de alimento (Schirmann et al., 2012), como sucedió en las vaquillonas RA. A su vez, el patrón de rumia a lo largo del estudio fue más estable en las vaquillonas CON que en las vaquillonas RA, lo que podría estar relacionado con un mayor nivel de salud ruminal y bienestar animal en las primeras (Krause y Oetzel, 2006; DeVries et al., 2009). A su vez, las vaquillonas RA pasaron más tiempo de pie que las vaquillonas CON durante los primeros RS. De manera similar, en muchos estudios se determinó que los animales estresados reducen su tiempo de rumia y reposo (Grant y Albright, 2001; Herskin et al., 2004; Bristow y Holmes, 2007; Fregonesi et al., 2007), y aumentan el tiempo en el que se mantienen de pie (Wilcox et al., 2013).

En forma paralela a los cambios del patrón de comportamiento, también hubo alteraciones en las concentraciones de algunos metabolitos asociados al estrés social en las vaquillonas RA. En este sentido, las concentraciones de urea y albúmina, y la relación albúmina/globulinas fueron menores en las vaquillonas RA que en las CON, lo que podría indicar mayores niveles de estrés en las vaquillonas que fueron reagrupadas (Jazbec et al., 1990; Petersen et al., 2004; Celi et al., 2012). Sin embargo, no se pueden descartar otras posibles explicaciones para los cambios en las concentraciones de ciertos metabolitos como la urea, tales como diferencias en el consumo de proteína (Preston et al., 1965) y/o el nivel de selectividad de la dieta (DeVries et al., 2008). En suma, tanto los cambios en el patrón de comportamiento ingestivo y postural como las concentraciones de metabolitos podrían estar relacionados con mayores niveles de inestabilidad social y estrés en las vaquillonas reagrupadas con frecuencia.

Los resultados relacionados con el grado de habituación o acostumbramiento a los RS son controversiales: mientras que Raussi et al. (2005) no reportaron habituación en vaquillonas reagrupadas hasta 16 veces, Veissier et al. (2001) encontraron que los terneros reagrupados hasta 14 veces pasaron menos tiempo acostados y más tiempo de pie solo durante el primer RS, sin diferencias en los siguientes RS. Las diferencias entre los estudios pueden

explicarse por la madurez sexual de los animales, lo que podría afectar la respuesta a los RS (Bouissou, 1977). En el presente estudio, a medida que los RS progresaron, el tiempo de consumo en las vaquillonas RA se incrementó en comparación con las vaquillonas CON, pero el tiempo de rumia y descanso fue menor. A su vez, los cambios en el estado metabólico fueron evidentes a lo largo de los RS, y se observaron efectos negativos sobre el desarrollo esquelético en las vaquillonas RA incluso después de realizado el último RS. Por lo tanto, es posible especular que en el presente estudio las vaquillonas RA no se habituaron a los RS frecuentes o, si bien podrían haberse habituado (ya que aumentó el tiempo de consumo en las vaquillonas RA), esto no fue suficiente para compensar los efectos negativos principales de la reagrupación. Se necesitan más estudios para determinar si la densidad de animales en el potrero, y/o modificar la proporción de animales intercambiados para determinar si esto modifica el número de RS que pueden realizarse en los animales con el fin de reducir las respuestas negativas a los mismos.

Al igual que en estudios anteriores realizados en vacas, vaquillonas y cabras (Raussi et al., 2005; Fernández et al., 2007; von Keyserlingk et al., 2008; Nogues et al., 2020), la cantidad de interacciones agonistas aumentó el día del intercambio social a lo largo de todo el experimento. Esta diferencia era esperable, ya que los animales realizan principalmente interacciones físicas de tipo agonista para intentar reestablecer el orden jerárquico del luego del ingreso de animales desconocidos (Hurnik et al., 1995). A su vez, se registraron mayor cantidad de interacciones agonistas y totales entre las vaquillonas RA y las vaquillonas “nuevas” el día del RS que, a los 7 días, lo que coincide con otros estudios que reportan que las interacciones agonistas disminuyen entre los 2 y 4 días luego del RS (Fernández et al., 2007; Kondo y Hurnik, 1990). Analizando el patrón de interacciones agonistas a lo largo de los RS, mientras en el grupo RA las mismas se mantuvieron relativamente constantes, en las vaquillonas CON se observaron oscilaciones con picos a lo largo de todo el experimento. En este sentido, se encuentra documentado que los animales en celo presenten un incremento de las interacciones sociales (Sveberg et al., 2013). Por tanto, el aumento de la cantidad de interacciones agonistas a lo largo de los diferentes RS en las vaquillonas CON podría relacionarse con la presencia de grupos sexualmente activos. En ambos grupos de vaquillonas, la cantidad de interacciones agonistas presentó una gran variabilidad a lo largo de los diferentes RS. En contraposición, en el estudio de Raussi et al. (2005), el comportamiento agonista aumentó a lo largo de los reagrupamientos. En relación al presente estudio, las principales diferencias radican en que en el estudio de Raussi et al. (2005) se evaluaron los animales que eran trasladados al nuevo grupo, y los RS fueron realizados en forma más frecuente. En ese sentido, sería posible especular que la menor cantidad de días entre RS podría afectar aún más el comportamiento social, y que los animales que son

intercambiados se verían más afectados que aquellos que se mantienen en el mismo lugar físico.

Las vaquillonas CON realizaron más interacciones de tipo afiliativas que las RA a lo largo de todo el experimento. Este hallazgo reafirma el concepto de que, en un grupo ya establecido, los animales se relacionan a través de interacciones de tipo afiliativas, debido a que la relación de dominancia-subordinación se mantiene (Kondo y Hurnik, 1990). En cuanto al patrón de interacciones afiliativas a lo largo de los diferentes RS, en la mayoría de los RS las vaquillonas CON realizaron mayor cantidad de interacciones afiliativas que las RA, y esto al igual que lo observado con las interacciones agonistas, se dio en forma de picos en las vaquillonas CON, pudiendo quizás relacionarse con la presencia de grupos sexualmente activos (Sveberg et al., 2013). En suma, similarmente a lo reportado en los parámetros de desarrollo corporal y reproductivo, así como en los indicadores de metabolismo energético, las alteraciones del comportamiento social consecuente a los RS reafirman que no existió una habituación a los mismos en las vaquillonas RA.

El rango jerárquico como la dominancia social se han relacionado de diversas maneras con los parámetros de crecimiento, parámetros productivos, el metabolismo energético y los indicadores de estrés (Mench et al., 1990; Phillips y Rind, 2002; Val-Laillet et al., 2008; Landaeta-Hernández et al., 2013; Fiol et al., 2017). En ese sentido, varios estudios reportaron que las vacas de mayor rango social producen más leche (Phillips y Rind, 2002; Val-Laillet et al., 2008) y tienen un menor intervalo parto-concepción (Landaeta-Hernández et al., 2013), mientras que las vaquillonas dominantes presentan un mayor desarrollo corporal y mayores niveles de glucosa (Fiol et al., 2017), que las vaquillonas de bajo rango social o subordinadas. A su vez, si bien los resultados no son coincidentes, se ha reportado que los animales de rango bajo jerárquico podrían tener niveles de estrés basal más alto que los de rango alto (Mench et al., 1990). En el presente estudio, las vaquillonas de rango social bajo presentaron mayores concentraciones de BHB luego de los RS 3, 6 y 8, lo que podría asociarse a los mayores niveles de estrés social que experimentan estos animales como consecuencia del RS en comparación con aquellas vaquillonas de rango medio y alto (Gupta et al., 2005). A su vez, las vaquillonas de alto rango presentaron mayores concentraciones de insulina que las de bajo rango social, lo que coincide con otros estudios que reportaron un mejor estatus energético en los animales dominantes que en los subordinados (Gupta et al., 2005; Fiol et al., 2017).

CONCLUSIÓN

Los RS frecuentes en vaquillonas lecheras, afectaron negativamente el desarrollo reproductivo y corporal, lo que se asoció con un metabolismo energético deficiente y patrones de comportamiento ingestivo, postural y social indicativos de mayores niveles de estrés social. A su vez, el rango social influyó sobre algunos indicadores del estatus energético en las vaquillonas reagrupadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adewuyi AA, Gruys E, Van Eerdenburg FJCM. (2005). Non esterified fatty acids (NEFA) in dairy cattle. A review. *Vet Quart* 27(3): 117-126.

Agenäs S, Heath MF, Nixon RM, Wilkinson JM, Phillips CJC. (2006). Indicators of undernutrition in cattle. *Animal Welfare* 15: 149-160.

Alamilla Rodríguez M, Calderón RC, Rosete JV, Rodríguez K, Vera HR, Arreguín JA, Nett TM, Gutiérrez CG, González E, Gómez-Chavarín M, Villa Godoy, A. (2017). Kisspeptina en becerras prepúberes: I. Influencia de la edad en la respuesta de LH, FSH y GH a kisspeptina-10 y su asociación con IGF-I, leptina y estradiol. *Revista mexicana de ciencias pecuarias* 8(4): 375-385.

Altmann J. (1974). Observational study of behavior: Sampling methods. *Behav* 49: 227-267.

Álvarez G. (1996). Campos de recría por sistema de capitalización: una muy rentable sociedad entre ganaderos y lecheros. *Hemisferio Sur*, 27p. <http://www.scielo.edu.uy/pdf/agro/v14n2/v14n2a08.pdf>. Fecha de consulta: 30/06/21.

Álvarez J, Astigarraga L. (2006). Nuevas empresas rurales y desarrollo agrícola. Una contribución al desarrollo de las capacidades de gestión. Montevideo, Facultad de Agronomía. 42p.

Amstalden M, Garcia MR, Williams SW, Stanko RL, Nizielski SE, Morrison CD, Keisler DH, Williams GL. (2000). Leptin gene expression, circulating leptin, and luteinizing hormone pulsatility are acutely responsive to short-term fasting in prepubertal heifers: relationships to circulating insulin and insulin-like growth factor I. *Biology of reproduction* 63(1): 127-133.

Arthur GH. (1991). Reproducción y obstetricia en veterinaria. Ed. Interamericana McGraw-Hill. México, D.F.

Bach A, Juaristi JL, Ahedo J. (2006). Case Study: Growth Effects of Regrouping Dairy Replacement Heifers with Lighter Weight and Younger Animals. *Prof Anim Sci* 22: 358-361.

Barnett JL, Hemsworth PH, Cronin GM. (1993). Does intensive pig farming have a viable future? - Concerns over housing and welfare. *Proceed New Zealand Soc Anim Prod* 53: 219-221.

Bath DL, Dickinson FN, Tucker HA, Appleman RD. (1978). *Dairy cattle: principles, practices, problems, profits*. Second edition: 292-293.

Berra G. (2005). Buenas prácticas en la crianza y recría de vaquillonas de tambo. En: *XXXIII Jornadas Uruguayas de Buiatría*. Pp: 89-110.

Block SS, Smith JM, Ehrhardt RA, Diaz MC, Rhoads RP, Van Amburgh ME, Boisclair YR. (2003). Nutritional and developmental regulation of plasma leptin in dairy cattle. *J Dairy Sci* 86: 3206–3214.

Bøe KE, Færevik G. (2003). Grouping and social preferences in calves, heifers and cows. (2003). *App Anim Behav Sci* 80: 175-190.

Bouissou MF. (1972). Influence of body weight and presence of horns on social rank in domestic cattle. *Anim Behav* 20: 474-477.

Bouissou MF. (1977). Etude du développement des relations de dominance-subordination chez les bovins a l'aide d'épreuves de compétition alimentaire. *Biol. Behav.* 2: 213–221.

Bouissou MF, Boissy A, Neindre P, Veissier I. (2001). The social behaviour of cattle. En: Keeling L.J, Gonyou H.W, editors. *Social behaviour in farm animals*. Wallingford, UK: CABI Publishing, Cap. 5, pp. 113-45.

Boulton AC, Rushton J, Wathes DC. (2017). An empirical analysis of the cost of rearing dairy heifers from birth to first calving and the time taken to repay these costs. *Animal* 11(8): 1372-1380.

Brennan Jr FX, Fleshner M, Watkins LR, Maier SF. (1996). Macrophage stimulation reduces the cholesterol levels of stressed and unstressed rats. *Life sciences* 58(20): 1771-1776.

Brouns F. Edwards SA. (1994). Social rank and feeding behaviour of group housed sows fed competitively or ad libitum. *Applied Anim Behav Sci* 39(3): 225-235.

Brickell JS, Bourne N, McGowan MM, Wathes DC. (2009). Effect of growth and development during the rearing period on the subsequent fertility of nulliparous Holstein-Friesian heifers. *Theriogenology* 72: 408-416.

Bristow DJ, Holmes DS. (2007). Cortisol levels and anxiety related behaviors in cattle. *Physiol Behav* 90: 626–628.

Byerley DJ, Staigmiller RB, Berardinelli JG, Short RE. (1987). Pregnancy Rates of Beef Heifers Bred Either on Puberal or Third Estrus. *J Anim Sci* 65: 645-650.

Ceciliani F, Ceronb JJ, Eckersallc PD, Sauerweind D. (2012). Review: Acute phase proteins in ruminants. *Journal of Proteomics* 75: 4207-4231.

Celi P, Merlo M, Barbato O, Gabai G. (2012). Relationship between oxidative stress and the success of artificial insemination in dairy cows in a pasture-based system. *Vet J* 193: 498- 502.

Chelikani PK, Ambrose DJ, Keisler DH, Kennelly JJ. (2009). Effects of dietary energy and protein density on plasma concentrations of leptin and metabolic hormones in dairy heifers. *J Dairy Sci* 92: 1430-1441.

Chilibroste P, Soca P, Mattiauda DA, Bentancur O, Robinson PH. (2007). Short term fasting as a tool to design effective grazing strategies for lactating dairy cattle: a review. *Aust J Exp Agric* 47(9): 1075-1084.

Chilibroste P, Batteggazzore G. (2014). Proyecto Producción Competitiva. Montevideo, pp 31.

Cook NB, Nordlund KV. (2004). Behavioral needs of the transition cow and considerations for special needs facility design. *Vet Clin Food Anim* 20: 495–520.

Chebel RC, Silva PRB, Endres MI, Ballou MA, Luchterhand KL. (2016). Social stressors and their effects on immunity and health of periparturient dairy cows. *J Dairy Sci* 99: 3217–3228.

Coonen JM, Maroney MJ, Crump PM, Grummer RR. (2011). Effect of a stable pen management strategy for precalving cows on dry matter intake, plasma nonesterified fatty acid levels, and milk production. *J Dairy Sci* 94(5): 2413-2417.

Costa M, Bussoni A, Mello R, Santoro M, Rodríguez D, Landa F. (2010). Campos de recría en el Uruguay: gestión de los recursos y formas contractuales. *Agrociencia Uruguay* 14(2): 66-76.

Day ML, Imakawa K, Wolfe PL, Kittok RJ, Kinder JE. (1987). Endocrine mechanisms of puberty in heifers. Role of hypothalamo-pituitary estradiol

receptors in the negative feedback of estradiol on luteinizing hormone secretion. *Biology Reprod* 37: 1054-1065.

De Vries H. (1995). An improved test of linearity in dominance hierarchies containing unknown or tied relationships. *Anim Behav* 50: 1375–1389.

De Vries H. (1998). Finding a dominance order most consistent with a linear hierarchy: a new procedure and review. *Anim Behav* 55: 827-843.

DeVries TJ, Von Keyserlingk MAG, Weary DM. (2004). Effect of feeding space on the inter-cow distance, aggression, and feeding behavior of free-stall housed lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 87(5): 1432-1438.

DeVries TJ, Dohme F, Beauchemin KA. (2008). Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: Feed sorting. *J Dairy Sci* 91: 3958-3967.

DeVries TJ, Beauchemin KA, Dohme F, Schwartzkopf-Genswein KS. (2009). Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: Feeding, ruminating, and lying behavior. *J Dairy Sci* 92(10): 5067-5078.

DeVries TJ. (2010). Review: Behaviour and its role in the nutritional management of the growing dairy heifer. *Canadian J Anim Sci* 90: 295–302.

Dhuyvetter DV, Caton JS, Judkins MB, McCollum FT. (1996, July). Manipulation of reproduction and lactation with supplementation in beef cattle. In *Am Soc Anim Sci* 47(1): 83-93.

Dickson DP, Barr GR, Wieckert DA. (1966). Social relationship of dairy cows in a feed lot. *J Anim Behav* 29: 195-203.

DIEA (2016). Anuario Estadístico Agropecuario 2020. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/datos-y-estadisticas/estadisticas/anuario-estadistico-agropecuario-2020>. Fecha de consulta: 30/06/2021.

Drackley JK, Cardoso FC. Parturition and postpartum nutritional management to optimize fertility in high-yielding dairy cows in confined TMR systems. (2014). *Animal* 8(1): 5-14.

Drews C. (1993). The concept and definition of dominance in animal behaviour. *Behav* 125(3): 283-313.

Duffield T. (2000). Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. *Vet Clin of North Am. Food Anim Pract* 16(2): 231– 253.

Dwyer CM, Bornett HLI. (2004). Chronic stress in sheep: assessment tools and their use in different management conditions. *Animal Welfare* 13: 293-304.

Dyer CJ, Simmons JM, Matteri RL, Keisler DH. (1997). Leptin receptor mRNA is expressed in ewe anterior pituitary and adipose tissues and is differentially expressed in hypothalamic regions of well-fed and feed-restricted ewes. *Domest Anim Endocrinol* 14: 119-128.

Faerevik G, Andersen IL, Jensen MB, Bøe KE. (2007). Increased group size reduces conflicts and strengthens the preference for familiar group mates after regrouping of weaned dairy calves (*Bos taurus*). *Appl Anim Behav Sci* 108: 215–228.

Ferrell CL. (1982). Effects of postweaning rate of gain on onset of puberty and productive performance of heifers of different breeds. *J Anim Sci* 55: 1272-1283.

Fernández MA, Alvarez L, Zarco L. (2007). Regrouping in lactating goats increases aggression and decreases milk production. *Small Rumin Res* 70: 228–232.

Fernandez-Novo A, Pérez-Garnelo SS, Villagrà A, Pérez-Villalobos N, Astiz S. (2020). The effect of stress on reproduction and reproductive technologies in beef cattle. A review. *Animals* 10(11): 2096.

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

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

Fregonesi JAC, Tucker B, Weary DM. (2007). Overstocking reduces lying time in dairy cows. *J Dairy Sci* 90: 3349–3354.

Galindo F, Broom DM. (2000). The relationships between social behaviour of dairy cows and the occurrence of lameness in three herds. *Research in Veterinary Science*, 69(1): 75-79.

Gojjam Y, Tolera A, Mesfin R. (2011). Management options to accelerate growth rate and reduce age at first calving in Friesian–Boran crossbred heifers. *Trop Anim Health Prod* 43: 393–399.

González LA, Ferret A, Manteca X, Ruíz-de-la-Torre JL, Calsamiglia S, Devant M, Bach A. (2008). Performance, behavior, and welfare of Friesian heifers

housed in pens with two, four, and eight individuals per concentrate feeding place. *J Anim Sci* 86: 1446-1458.

González-Grajales LA, Pieper L, Mengel S, Staufenbiel R. (2018). Evaluation of glucose dose on intravenous glucose tolerance test traits in Holstein-Friesian heifers. *J Dairy Sci* 101: 774–782.

Granger AL, Wyatt WE, Hembry FG, Craig WM, Thompson DL. (1990). Effects of breed and wintering diet on heifer postweaning growth and development. *J Anim Sci* 68: 304-316.

Grant RJ, Albright JL. (2001). Effect of Animal Grouping on Feeding Behavior and Intake of Dairy Cattle. *J Dairy Sci* 84(E. Suppl.): E156-E163.

Greer RC, Whitman RW, Staigmiller RB, Anderson DC. (1983). Estimating the impact of management decisions on the occurrence of puberty in beef heifers. *J Anim Sci* 56: 30-39.

Greter AM, Leslie KE, Mason GJ, McBride BW, DeVries TJ. (2010). Effect of feed delivery method on the behavior and growth of dairy heifers. *J Dairy Sci* 93: 1668–1676.

Gupta S, Earley B, Ting STL, Crowe MA. (2005). Effect of repeated regrouping and relocation on the physiological, immunological, and hematological variables and performance of steers. *J Anim Sci* 83: 1948–1958.

Gupta S, Earley B, Nolan M, Formentin E, Crowe MA. (2008). Effect of repeated regrouping and relocation on behaviour of steers. *Appl Anim Behav Sci* 110: 229–243.

Gutmann AK, Špinka M, Winckler C. (2020). Do familiar group mates facilitate integration into the milking group after calving in dairy cows?. *Appl Anim Behav Sci* 229: 105033.

Hafez ESE, Jainudeen MR, Rosnina Y. (2000) Hormonas, factores de crecimiento y reproducción. En: Hafez, E.S.E., Hafez, B. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7^a ed. Mexico, D.F. McGraw-Hill Interamericana, pp 33-55.

Hasegawa N, Nishiwaki A, Sugawara K, Ito I. (1997). The effects of social exchange between two groups of lactating primiparous heifers on milk production, dominance order, behavior and adrenocortical response. *Appl Anim Behav Sci* 51: 15-27.

Haydock KP, Shaw NH. (1975). The comparative yield method for estimating dry matter yield of pasture. *Aust J Exp Agric* 15: 663-670.

Heinrichs AJ, Hargrove GL. (1987). Standards of weight and height for Holstein heifers. *J Dairy Sci* 70(3): 653-660.

Heinrichs AJ, Lammers B. (1998). Monitoring dairy heifer growth. Penn State, College of Agricultural Sciences.

Herskin MS, Munksgaard L, Ladewig J. (2004). Effects of acute stressors on nociception, adrenocortical responses and behavior of dairy cows. *Physiol Behav* 83: 411–420.

Hoffman PC, Funk DA. (1992). Applied dynamics of dairy replacement growth and management. *J Dairy Sci* 75(9): 2504-2516.

Hoffman PC. (1997). Optimum body size of Holstein replacement heifers. *J Anim Sci* 75(3): 836-845.

Hubbard AJ, Foster MJ, Daigle CL. (2021). Impact of social mixing on beef and dairy cattle- A scoping review. *Appl Anim Behav Sci* 241: 105389.

Hurnik JF, Lewis NJ, Taylor A, Pinheiro Machado L. C. (1995). Social hierarchy. En: *Farm Animal Behaviour. Laboratory Manual*. 1a Ed. (Ed.) University of Guelph. Guelph, Canada. 79-89.

INML. Instituto Nacional para el Mejoramiento Lechero Uruguayo. Informe Técnico 2017. <https://www.mu.org.uy>

Iqbal J, Pompolo S, Considine RV, Clarke IJ. (2000). Localization of leptin receptor-like immunoreactivity in the corticotropes, somatotropes, and gonadotropes in the ovine pituitary gland. *Endocrinol* 141: 1515-1520.

Jawor PS, Stefaniak T, Rzasa A, Steiner S, Baumgartner W. (2008). Determination of selected acute phase proteins during the treatment of limb diseases in dairy cows. *Vet Med* 53: 173-183.

Jazbec, I. (1990). *Klinicko Laboratorijska Diagnostika*. Veterinarski Fakultet, Ljubljana.

Jensen MB, Proudfoot KL. (2017). Effect of group size and health status on behavior and feed intake of multiparous dairy cows in early lactation. *J. Dairy Sci* 100: 9759–9768.

Kang HJ, Lee IK, Piao MY, Kwak CW, Gu MJ, Yun CH, Kim HJ, Ahn HJ, Kim HB, Kim GH, Kim SK, Ko JY, Ha JK, Baiki M. (2017). Effects of road

transportation on metabolic and immunological responses in Holstein heifers. *J Anim Sci* 88: 140–148.

Kaufmann H. (1983). On the definitions and functions of dominance and territoriality. *Biological Reviews* 58(1): 1-20.

Krause KM, Oetzel GR. (2006). Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Anim Feed Sci Technol* 126(3-4): 215-236.

Keeling LJ, Gonyou HW. (2001). *Social Behaviour in Farm Animals*. CABI Publishing, Wallingford, UK.

von Keyserlingk MAG, Olenick D, Weary DM. (2008). Acute Behavioral Effects of Regrouping Dairy Cows. *J Dairy Sci* 91: 1011–1016.

Kondo S, Hurnik JF. (1990). Stabilization of social hierarchy in dairy cows. *Appl Anim Behav Sci* 27: 287-297.

Landaeta-Hernández AJ, Meléndez P, Bartolomé J, Rae DO, Archbald F. (2013). Effect of biostimulation and social organization on the interval from calving to resumption of ovarian cyclicity in postpartum Angus cows. *Theriogenology* 79: 1041–1044.

León HV, Hernández-Cerón J, Keisler DH, Gutierrez CG. (2004). Plasma concentrations of leptin, insulin-like growth factor-I, and insulin in relation to changes in body condition score in heifers. *J Anim Sci* 82(2): 445-451.

Lagger J. (2010). Crecimiento Intensivo de Cría y Recría de Vaquillonas, aplicando los Principios de Bienestar. *Vet Arg XXVII* (265): 1-19.

Lammers BP, Heinrichs AJ, Kensingers RS. (1999). The effects of accelerated growth rates and estrogen implants in prepubertal Holstein heifers on growth, feed efficiency, and blood parameters. *J Dairy Sci* 82: 1746-1752.

Lammoglia MA, Willard ST, Oldham JR, Randel RD. (1996). Effects of dietary fat and season on steroid hormonal profiles before parturition and on hormonal, cholesterol, triglycerides, follicular patterns, and postpartum reproduction in Brahman cows. *J Anim Sci* 74(9): 2253-2262.

Le Cozler Y, Lollivier V, Lacasse P, Disenhaus C. (2008). Rearing strategy and optimizing first-calving targets in dairy heifers: a review. *Animal* 2(9): 1393–1404.

McEwen BS. (1998). Protective and Damaging Effects of Stress Mediators. *New Engl J Med* 338: 171-179.

Meikle A, Cavestany D, Carriquiry M, Adrien ML, Artegoitia V, Pereira I, Rupprechter 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, Chilbroste P. (2013). Revisión: Avances en el conocimiento de la vaca lechera durante el período de transición en Uruguay: un enfoque multidisciplinario. *Agrociencia Uruguay* 17(1): 1141-152.

Mellor DJ, Cook CJ, Stafford KJ. (2000). Quantifying some response to pain as a stressor. En: *The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Welfare*. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 171- 198.

Mench JA, Swanson JC, Stricklin WR. (1990). Social stress and dominance among group members after mixing beef cows. *Canadiense Revista de Ciencia Animal* 70(2): 345-354.

Mialon MM, Renand G, Krauss D, Ménissier F. 2001. Genetic relationship between cyclic ovarian activity in heifers and cows and beef traits in males. *Genet Sel Evol* 33(3): 273.

Miranda-De La Lama GC, Pascual-Alonso M, Guerrero A, Alberti P, Alierta S, Sans P, Gajan JP, Villaroel M, Dalmau A, Velarde A, Campo MM, Galindo F, Santolaria MP, Sañudo C, María GA. (2013). Influence of social dominance on production, welfare and the quality of meat from beef bulls. *Meat Science* 94(4): 432-437.

Moberg GP. (2000). Biological Response to Stress: Implications for Animal Welfare. En: Moberg GP, Mench JA, editors. *The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare*. CABI Publishing, Cap. 1, pp. 1–22. Wallingford, Oxon, UK.

Moberg GP, Mench JA. (2000). *The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare*. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, U.K.

Nogues E, Lecorps B, Weary DM, von Keyserlingk MAG. (2020). Individual Variability in Response to Social Stress in Dairy Heifers. *Animals* 10: 1440.

O'Connell NE, Wicks HCF, Carson AF, McCoy MA. (2008). Influence of post-calving regrouping strategy on welfare and performance parameters in dairy heifers. *Appl Anim Behav Sci* 114: 319–329.

Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PMH. (2004). Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res* 35: 163–187.

Phillips CJC, Rind MI. (2002). The effects of social dominance on the production and behavior of grazing dairy cows offered forage supplements. *J Dairy Sci* 85 (1): 51-59.

Preston RL, Schnakenberg DD, Pfander H. (1965). Protein Utilization in Ruminants I. Blood urea nitrogen as affected by protein intake. *J Nutr* 86: 281-288.

Proudfoot K, Habing G. (2015). Review: Social stress as a cause of diseases in farm animals: Current knowledge and future directions. *Vet J* 206: 15-21.

Raussi S, Boissy A, Delval E, Pradel P, Kaihilahti J, Veissier I. (2005). Does repeated regrouping alter the social behaviour of heifers?. *Appl Anim Behav Sci* 93: 1–12.

Raussi S, Boissy A, Andanson S, Kaihilahti J, Pradel P, Veissier I. (2006). Repeated regrouping of pair-housed heifers around puberty affects their behavioural and HPA axis reactivities. *Anim Res* 55: 131–144.

Rawlings NC, Evans ACO, Honaramooz A, Bartlewski PM. (2003). Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. *Anim Reprod Sci* 78: 259-270.

Rayssiguier Y, Mazur A, Gueux E, Reid IM, Roberts CJ. (1988). Plasma lipoproteins and fatty liver in dairy cows. *Research in veterinary science* 45(3): 389-393.

Rice M, Jongman EC, Butler KL, Hemsworth PH. (2016). Relationships between temperament, feeding behaviour, social interactions, and stress in lambs adapting to a feedlot environment. *Appl Anim Behav Sci* 183: 42-50.

Roche JR, Friggens NC, Kay JK, Fisher MW, Stafford KJ, Berry DP. (2009). Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *J Dairy Sci* 92: 5769-5801.

Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* 21: 55-89.

Sárová R, Spinka M, Stehulová I, Ceacero F, Simecková M, Kotrba R. (2013). Pay respect to the elders: age, more than body mass, determines dominance in female beef cattle. *Anim Behav* 86: 1315-1323.

Schein W, Fohorman H. (1955) Social dominance relationships in a herd of dairy cattle. *British J Anim Behav* 3: 45-55.

Schirmann K, Chapinal N, Weary DM, Heuwieser W, von Keyserlingk MAG. (2011). Short-term effects of regrouping on behavior of prepartum dairy cows. *J Dairy Sci* 94: 2312-2319.

Schirmann K, Chapinal N, Weary DM, Heuwieser W, von Keyserlingk MAG. (2012). Rumination and its relationship to feeding and lying behavior in Holstein dairy cows. *J Dairy Sci* 95: 3212–3217.

Schoppee PD, Armstrong JD, Harvey RW, Whitacre MD, Felix A, Campbell RM. (1996). Immunization against Growth Hormone Releasing Factor or Chronic Feed Restriction Initiated at 3.5 Months of Age Reduces Ovarian Response to Pulsatile Administration of Gonadotropin-Releasing Hormone at 6 Months of Age and Delays Onset of Puberty in Heifers. *Biol Reprod* 55: 87-98.

Sejrsen K, Purup S. (1997). Influence of Prepubertal Feeding Level on Milk Yield Potential of Dairy Heifers: a review. *J Anim Sci* 75: 828-835.

Sevi A, Taibi L, Albenzio M, Muscio A, Dell'Aquila S, Napolitano F. (2001). Behavioral, adrenal, immune, and productive responses of lactating ewes to regrouping and relocation. *J Anim Sci* 79: 1457- 1465.

Silva PRB, Moraes JGN, Mendonça LGD, Scanavez AA, Nakagawa G, Fetrow J, Endres MI, Chebel RC. (2013). J. Effects of weekly regrouping of prepartum dairy cows on metabolic, health, reproductive, and productive parameters. *J Dairy Sci* 96: 4436– 4446.

Sirotkin AV, Makarevich AV, Kubovicova E, Laurincik J, Alwasel S, Harrath AH. (2018). Cow body condition affects the hormonal release of ovarian cells and their responses to gonadotropic and metabolic hormones. *Theriogenology* 110: 142- 147.

Smid AMC, Weary DM, Bokkers EAM, von Keyserlingk MAG. (2019). Short communication: The effects of regrouping in relation to fresh feed delivery in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci* 102 No 7.

Stern MD, Calsamiglia S, Endres MI. (1994). Dinámica del metabolismo de los hidratos de carbono y del nitrógeno en el rumen. X Curso de especialización FEDNA, Madrid.

Sveberg G, Refsdal AO, Erhard HW, Kommisrud E, Aldrin M, Tvette IF, Buckley F, Waldmann A, Ropstad E. (2013). Sexually active groups in cattle—a novel estrus sign. *J Dairy Sci* 96(7): 4375-4386.

Swanson EW. (1967). Optimum growth patterns for dairy cattle. *J Dairy Sci* 50: 244.

Taylor VJ, Beever DE, Bryant MJ, Wathes DC. (2004). First lactation ovarian function in dairy heifers in relation to prepubertal metabolic profiles. *J Endocrinol* 180: 63-75.

Tozer PR, Heinrichs AJ. (2001). What affects the costs of raising replacement dairy

heifers: A multiple-component analysis. *J Dairy Sci* 84: 1836-1844.

Ungerfeld R, Bielli A. (2012). Seasonal and social factors affecting reproduction. *Livestock reproduction: bovine, swine, and ruminants* Encyclopaedia of life support systems (EOLSS).

Val-Laillet D, Pasillé AM, Rushen J, von Keyserlingk MAG. (2008). The concept of social dominance and the social distribution of feeding-related displacements between cows. *Appl Anim Behav Sci* 111: 158–172.

Van Amburgh ME, Galton DM, Bauman DE, Everett RW, Fox DG, Chase LE, Erb HN. (1998). Effects of Three Prepubertal Body Growth Rates on Performance of Holstein Heifers During First Lactation. *J Dairy Sci* 81(2): 527-538.

Veissier I, Boissy A, dePassillé AM, Rushen J, van Reenen C.G, Roussel S, Andanson S, Pradel P. (2001). Calves' responses to repeated social regroupings and relocation. *J Anim Sci* 79: 2580-2593.

Velazquez MA, Spicer LJ, Wathes DC. (2008). The role of endocrine insulin-like growth factor-I (IGF-I) in female bovine reproduction. *Dom Anim Endoc* 35: 325-342.

Walker RS, Martin RM, Gentry GT, Gentry LR. (2015). Impact of cow size on dry matter intake, residual feed intake, metabolic response, and cow performance. *J Anim Sci* 93(2): 672-684.

Webb R, Garnsworthy PC, Gong JG, Armstrong DG. (2004). Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. *J Anim Sci* 82: E63-74.

Wilcox CS, Schutz MM, Rostagno MR, Lay DC Jr., Eicher SD. (2013). Repeated mixing and isolation: measuring chronic, intermittent stress in Holstein calves. *J Dairy Sci* 96: 7223–7233.

Yamada T, Kawakami SI, Nakanishi N. (2003). The relationship between plasma leptin concentrations and the distribution of body fat in crossbred steers. *J Anim Sci* 74: 95–100.

Yelich JV, Wettemann RP, Marston TT, Spicer LJ. (1996). Luteinizing hormone, growth hormone, insulin-like growth factor-1, insulin and metabolites before puberty in heifers fed to gain at two rates. *Dom Anim End* 13: 325-338.

Zanton GI, Heinrichs AJ. (2005) Meta-Analysis to assess effect of prepubertal average daily gain of Holstein heifers on first-lactation production. *J Dairy Sci* 88 (11): 3860-3867.

Zieba DA, Amstalden M, Williams GL. (2005). Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: A comparative review. *Dom Anim Endoc* 29: 166–185.

ANEXO 1. MANUSCRITO

Frequent social regroupings affect body and reproductive development, metabolic status and behavioral time budgets in dairy heifers

Moratorio M.^{a*}, M. Carriquiry^b, R. Ungerfeld^c, C. Fiol^a

^a Departamento de Producción Animal y Salud de los Sistemas Productivos, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Ruta 1 km 42.5, 80100, San José, Uruguay.

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

^c Departamento de Biociencias Veterinarias, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Lasplaces 1550, 11600, Montevideo, Uruguay.

*Corresponding author.

Abstract

Context: Social regroupings (SR) in ruminants provokes a social destabilization that affects behavior and can produce negative impacts on development.

Aim: Compare the ingestive and postural behaviors, metabolic status, and body and reproductive development of dairy heifers subjected or not to frequent SR.

Methods: Holstein heifers (153.3 ± 16.1 kg, 11 mo-old) were allocated to 2 homogenous groups: 1) Control (CON; $n = 14 + 5$ “fix” heifers) and 2) Regrouped (RG; $n = 14 + 5$ “exchanged” heifers), in which “exchanged” heifers were switched for 5 “novel heifers” every 21 d (total = 10 SR; Day 0 = SR 1). In each SR, the BW, ADG, withers height (WH) and body condition score (BCS) were registered, blood hormones and metabolites determined, and ingestive and postural behaviors were monitored through scan sampling. Date at first heat and later heats were registered by patches.

Key results: Withers height was greater ($P = 0.01$) in SR 9 (123 vs 120 cm ± 1.8) and 10 (124 vs 122 cm ± 1.8), while BCS was greater ($P = 0.01$) in SR 4 (3.5 vs 3.2 ± 0.15) and 5 (3.4 vs 3.1 ± 0.15), in CON than RG heifers. Control heifers showed first heat earlier (93 ± 9 d vs 126 ± 14 d; $P < 0.05$) than RG heifers. Insulin growth factor-1 (171.3 vs 120.0 ng/mL ± 10.1), glucose (4.3 vs 4.2 mmol/L ± 0.07) and albumin (30.0 vs 28.6 g/l ± 0.6) concentrations were greater in CON than RG ($P < 0.05$). In contrast, NEFA concentration was greater in RG than CON (0.35 vs 0.30 mmol/L ± 0.04 ; $P < 0.05$). Regrouped heifers were observed more times eating (0.45 vs 0.33 ± 0.01), but less times ruminating (0.21 vs 0.24 ± 0.01) and lying (0.12 vs 0.14 ± 0.01) than CON ($P < 0.01$).

Conclusion: Frequent SR negatively affected body and reproductive development, energetic metabolism and determined altered behavioral patterns.

Implications: These alterations can compromise the future production and reproduction of the heifer and thus, affect the dairy production system as a whole.

1. Introduction

Raising procedures in replacement dairy heifers have strong influence on the oncoming reproductive and productive performances of the cow (Le Cozler *et al.*, 2008; Bach, 2011). Although management decisions and environmental conditions directly affect heifers' development, it should be deeply understood how the different practices influence the development of heifers in dairy replacement systems (Bach, 2011). For example, in many systems heifers are frequently regrouped, a practice that provokes social instability and re-establishment of hierarchies (Barnett *et al.*, 1993), with direct impact on animal behavior and productivity (Veissier *et al.*, 2001; Grant and Albright, 2001; Raussi *et al.*, 2005; von Keyserlingk *et al.*, 2008). Social regroupings (SR) are strong stressors (Proudfoot and Habing, 2015), thus affecting the behavioral patterns, performance and welfare (Keeling and Gonyou, 2001; Bøe and Færevik, 2003).

Mixing animals from different groups triggers an increase in the frequency of vocalizations and agonistic behaviors, including headers and displacements in dairy cows (Grant and Albright, 2001). During the first days after regrouping physical interactions predominate over non-physical interactions (Kondo and

Hurnik, 1990). Social regroupings shorten the eating (von Keyserlingk *et al.*, 2008) and ruminating time (Schirmann *et al.*, 2011), and prolong time allocated to vigilance behavior (Schirmann *et al.*, 2011). If SR are repeated several times, Gupta *et al.* (2008) reported an increase in time allocated to eat and remain standing during the first 2 days after regrouping, while lying time subsequently increased, and this difference increased as SR in steers progressed. Similarly, in calves, social and ingestive behaviors were affected only in the first SR but no changes occur in the following SRs, so Veissier *et al.* (2001) and Gupta *et al.* (2008) considered that animals get used to repeated SR. In contrast, Raussi *et al.* (2005) reported that dairy heifers do not adapt easily, and successive SR repeatedly affect them. It is possible that sexual maturity of the animals promotes a greater strength of hierarchical structures explaining this apparent discrepancy.

Social challenges can also affect the body and reproductive development in growing animals (DeVries, 2010; Greter *et al.*, 2010; Fiol *et al.*, 2017). Bach *et al.* (2006) reported that heifers regrouped with younger and lighter heifers had greater average daily gain (ADG) after regrouping than non-regrouped ones, which is possibly explained by a reinforcement of their social position. In contrast, regrouping steers every 14 days did not affect their body weight (BW) nor their ADG (Gupta *et al.*, 2008). However, the stress responses provoked by SR might modify the energetic requirements, and thus, heifers' metabolic status (Moberg and Mench, 2000). Gupta *et al.* (2005) reported that SR increases metabolism energy demand, and thus, concentrations of non-esterified fatty acids (NEFA), beta-hydroxybutyrate (BHB), albumin, urea and the glycemia

increased in regrouped animals. According to our knowledge, no studies evaluated the effects of repeated SR on reproductive performance.

Contract dairy heifer rearing systems allow dairy farmers to increase grazing platforms for the milking cows (Álvarez, 1996), as well as specialize and simplify labor. In these systems, heifers that arrive from different farms are usually mixed, and frequently regrouped on several occasions during the period which they stay allocated there. We hypothesized that frequent SR affects behavioral pattern and metabolic status and thus, decreases the growth rate, and delays first estrus, in dairy heifers managed in a commercial contract dairy farm. Therefore, the objective of the study was to compare the ingestive and postural behaviors, the metabolic status, and the body and reproductive development of dairy heifers subjected or not to frequent SR.

2. Materials and methods

2.1. Animals, housing and experimental treatments

Animal care, handling, and protocols were approved by the Comisión de Ética en el Uso de Animales (Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay). The study was performed in a private farm located in Canelones, Uruguay (34° S, 55° W), from September (spring) to May (autumn). Overall, the study comprised 83 Holstein heifers arrived from five dairy farms during August. After arrival, heifers had an adaptation period (30 days) to

management conditions, after which they were allocated to two homogenous groups according to their BW (153.3 ± 16.1 kg, mean \pm SEM), age (9 to 11 months) and farm of origin: 1) Control (group CON; n = 14 + 5 “fix” heifers), and 2) Regrouped (group RG; n = 14 + 5 “exchanged” heifers). The five “exchanged” animals of RG were switched every 21 days, introduced every time other five previously unknown heifers. Those five new heifers were similar in BW and age than those that were retired. Regrouping was always done between 08:00 and 10:00 h (total = 10 SR; Day 0 = SR 1). Overall, RG heifers were subjected to 10 SR. Both groups grazed, in separate paddocks with a mixed pasture of fescue and red clover on weekly stripes with a minimum non-restrictive forage allowance of 8 % (8 kg DM/ 100 kg BW). Pasture availability was monitored monthly (range: 810 to 2930 kg DM/ha, no differences between groups) by the double sampling technique (Haydock and Shaw, 1975).

2.2. Body and reproductive development

Body weight, withers height (WH) and body condition score (BCS) were determined every 21 days, 2 days after each SR. Heifers were weighed in the morning (07:00 to 10:00 h) using a portable electronic scale and ADG (kg/d) for each period was calculated. Body condition score was estimated by visual observation using a scale adapted for heifers (range 1 to 5; Heinrichs and Lammers, 1998). Withers height was measured with a ruler placed next to the forelegs, with the animal standing on a well level surface. A level was used to ensure that the adjustable part (on the heifer’s withers) was parallel to the floor when the highest point of the withers was measured.

When heifers reached a minimum BW of 220 kg BW (Sejrsen and Purup, 1997), heat detectors (Estroprotect- Heat Detector, Minnesota, USA) were placed on each animal. Patches were controlled every day, and replaced every 14 days.

2.3. Metabolic hormones and metabolites

Blood samples were collected every 21 days, 2 days after each SR, from the coccygeal vein in the morning (07:00 to 10:00 h). Blood was placed in 2 tubes, one dry, and another with sodium fluoride to determine glycaemia. Samples were centrifuged at 3,000 rpm for 15 min within 2 to 4 h after collection, and serum or plasma was stored at -20°C until measurements were performed. Insulin concentrations were quantified by an immunoradiometric assay (IRMA; DIASource ImmunoAssays S.A., Louvain-la-Neuve, Belgium). The sensitivity of insulin of the assay was $0.42\ \mu\text{IU/mL}$; intra assay CVs were 10.2 and 5.5%, for low and high controls, respectively. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) concentrations were also quantified by an immunoradiometric assay (IRMA; Cisbio Bioassays, Codolet, Francia) in SR 1, 3, 4, 5, 7 and 9. The sensitivity of IGF-1 assay was $0.4\ \text{ng/ml}$; intra assay CVs were 6.6 and 6.2% for low and high controls, respectively. Both hormones assays were previously used in bovines (Astessiano *et al.*, 2015). Glucose, albumin, NEFA, urea, PPT (total plasmatic protein), cholesterol and BHB concentrations were determined by spectrophotometry (spectrophotometer A 25, BioSystem S.A., Barcelona, Spain) using commercial enzymatic kits (BioSystem S.A., Barcelona, Spain). All

samples were determined in the same assay for each metabolite, and internal quality controls were included in each assay.

2.4. Ingestive and postural behavior

Every 21 days, one day after each SR, ingestive (eating, ruminating) and postural (lying, standing) behaviors were registered through scan sampling every 10 min (Altmann, 1974) during diurnal hours (08:00 to 16:00 or 17:00 h). Thus, a total of 48 to 54 behavioral recordings were performed per day and per animal. The animal was considered eating when the head was in the pasture or when it was chewing grass, ruminating when it was chewing rumination (standing or lying), lying down when it was lying in sternal or lateral decubitus without ruminating or eating, and standing when it was with the four members supported in the station (without walking, ruminating, eating or drinking).

2.5. Statistical Analysis

Data were assessed using SAS software (SAS® University Edition, Cary, North Carolina, USA), and a multilevel analysis was used in order to deal with possible dependency and confounding effects (Schank and Koehnle, 2009; Young, 2018). Data were analyzed in a completely randomized design with heifer as the experimental unit. Body growth parameters, cumulative estrus and metabolites concentrations were analyzed using the MIXED procedure, while hormones' concentrations and ingestive and postural behaviors were analyzed by the GLIMMIX procedure. The model included as fixed effects the group (RG

vs. CON), SR (as the repeated measure), and their interaction, and farmer origin and animal as random effects. Baseline BW and concentrations of hormones and metabolites were included as covariates. For ingestive behavior, frequency of each behavior was calculated as the ratio of the number of times each heifer was observed doing each activity to the total number of scans per day ($n = 48$ or 54). The hours of the behavioral recording were grouped in 2 periods (HS), in order to determined differences along the day between groups: AM (first 5 hours of behavioral sampling) and PM (last 4 or 5 hours of behavior sampling). The model included as fixed effects the group, SR (as repeated data), period, and their interaction, and farmer origin and animal as random effects. The covariance structure AR (1) (constant time periods) or SP (pow) (non-constant periods) were used, and the Kenward – Rogers procedure was used to adjust the degrees of freedom. First heat detected was analyzed with the LIFETEST procedure. Means were considered to differ when $P \leq 0.05$ and tendencies were declared when $0.05 > P \leq 0.1$. The results are presented as LSmeans \pm SEM.

3. Results

3.1. Body and reproductive development

Body weight and ADG changed as SR progressed (data not shown), with no group nor interaction group by SR, while there was an interaction between group and number of SR in WH and BCS (Table 1). Control heifers had greater

WH at SR 9 and 10, and greater BCS than RG heifers at SR 4 and 5 ($P = 0.01$; Fig. 1A and 1B). In addition, WH of CON heifers tended to be greater than that of RG heifers in SR 8 ($P = 0.06$). Control heifers came into estrus the first time earlier and presented greater cumulative estrus index than RG heifers ($P < 0.01$; Table 1).

Insert Table 1 here.

Fig. 1A and Fig. 1B.

3.2. Metabolic hormones and metabolites

Insulin concentration was not affected by group, but there was a group by SR interaction (Table 2): concentration of RG was greater than that of CON at SR 5 (5.02 ± 0.7 vs 3.2 ± 0.6 ; $P = 0.05$) and tended to be greater at SR 9 (7.1 ± 0.9 vs 5.4 ± 0.8 ; $P = 0.07$). There were treatment effects in IGF-1 and glucose concentrations, as both were greater in CON than RG heifers ($P < 0.01$ and $P = 0.04$, respectively; Table 2). There was also a group by SR interaction in glycaemia ($P = 0.05$), as it tended to be greater at SR 3 ($P = 0.09$), and was greater at SR 6 in CON than RG heifers ($P < 0.01$) (Fig. 2A). Albumin concentrations, albumin/globulin ratio and urea concentrations were greater in CON than RG heifers ($P < 0.01$; Table 2). In addition, there was an interaction group by SR in urea concentrations ($P < 0.01$), as CON heifers had greater serum urea than RG heifers at SR 3, 4, 5, 8, 9 and 10 ($P < 0.01$ for all; Fig. 2B). Non-esterified fatty acids concentrations were greater in RG than CON heifers ($P = 0.04$; Table 2), and were also affected by the group by SR interaction ($P < 0.01$). Plasma NEFA was greater in RG than CON heifers at SR 3, 5 and 7 (Fig.

2C). Total plasma proteins and cholesterol changed only due to SR (data not shown), while non-significant effects of group or SR were observed in BHB concentrations (Table 2).

Insert Table 2.

Fig. 2A, Fig. 2B and Fig. 2C.

3.3. Ingestive and postural behavior

Overall, RG heifers were observed more time eating than CON heifers ($P < 0.01$), but there was also a group by SR interaction ($P < 0.01$; Table 3). Regrouped heifers eating time was greater at SR 6, 7, 8 and 10 ($P < 0.01$ for all), while at SR 1, 4 and 9 it was greater in CON heifers (Fig. 3 A1). There was also a triple interaction, group by SR by HS ($P < 0.01$): during AM period CON heifers tended to were more time eating in SR 4, and were more time eating in SR 7, 8 and 9 (Fig. 3 A2), but tended to were less time eating at SR 5, and were less time eating ($P < 0.01$) at SR 6 and 10, than RG heifers (Fig. 3 A2). During PM, CON heifers were more time eating at SR 1, 3, 4 and 9 (Fig. 3 A3), whereas they were observed eating less time at SR 6, 7, 8 and 10 than RG heifers (Fig. 3 A3).

Control heifers ruminated longer time than RG heifers ($P < 0.01$), and there was also a group by SR interaction ($P < 0.01$; Table 3). Control heifers were observed ruminating more time at SR 1, 5, 6 and 8, and less time at SR 3 and 9 than RG heifers (Figure 3 B1). There was also a group by SR by HS interaction ($P < 0.01$): during AM, CON heifers were more time ruminating at SR 1 but less

time at SR 3 and 7 than RG heifers (Fig. 3 B2). During PM, CON heifers were more time ruminating at SR 1, 5 and 8, but less time ruminating at SR 3 and 9 than RG heifers (Fig. 3 B3).

Insert Table 3.

Fig. 3 A1, Fig. 3 A2 and Fig. 3 A3.

Fig. 3 B1, Fig. 3 B2 and Fig. 3 B3.

Control heifers were observed lying more times than RG heifers ($P = 0.03$), and there was a group by SR interaction ($P < 0.01$; Table 3). Control heifers were lying more time at SR 2, 3, 6, 8 and 10, but less time at SR 1 and 9 than RG heifers (Fig. 4 A1). There was a group by SR by HS interaction ($P < 0.01$) for lying activity. During AM, CON heifers were more time lying at SR 2, 3, 5, 6 and 8 and tended to spend or spent less time at SR 1 and at SR 7, respectively, than RG heifers (Fig. 4 A2). During PM, lying time at SR 6, 7, 8 and 10 was greater and at SR 1, 4 and 9 was shorter in CON than RG heifers (Fig. 4 A3).

Standing behavior was not affected by group, but there was a group by SR interaction ($P < 0.01$; Table 3), as RG heifers were observed standing more time at SR 2, 4, 5 and 8, but less time at SR 6 and 10 than CON heifers (Fig. 4 B1). In addition, there was a group by SR by HS interaction in the standing activity ($P < 0.01$). During AM, RG heifers were more time standing at SR 2, 4, 5 and 8, but less time at SR 7 and 10 than CON heifers (Fig. 4 B2). During PM, RG heifers were more time standing only at SR 5 but less time at SR 6, 8 and 10 than CON heifers (Fig. 4 B3).

Insert Fig. 4 A1, Fig. 4 A2 and Fig. 4 A3.

Fig. 4 B1, Fig. 4 B2 and Fig. 4 B3.

4. Discussion

Frequent SR of dairy heifers affected their behavioral time budget and their energy metabolism, which in turn delayed body development and onset of the first estrus. In agreement with previous studies in ewes (Sevi *et al.*, 2001) and steers (Gupta *et al.*, 2008), heifers' BW and ADG were not affected by the treatment. In contrast, BCS and WH were temporarily modified by SR. The greater BCS and WH of CON than RG heifers as SR advanced suggests that several SR are needed to impact on body reserves and skeletal development in heifers. Moreover, WH at the 10th SR in RG heifers (122 cm) was still below the minimum WH threshold considered for the first service in Holstein heifers (125 cm; Hoffman, 1997; Heinrichs and Lammers, 1998). The need for an accumulated number of SR before these differences were observed is consistent with the long time needed to detect changes on variables as WH or BCS (Hoffman, 1997). Thus, although SR can have negative effects on body reserves and skeletal development earlier, effects are strong enough to be evidenced when at least four SR are performed in a group of growing heifers.

According to our knowledge, this is the first study that determined that frequent SR negatively affects the reproductive development in females. In effect, confirming our hypothesis, frequent SR delayed the onset of the first estrus more than one month. The onset of the first estrus in CON heifers matches with

the period in which these heifers had greater BCS, which agrees with previous studies in heifers and cows (Mialon *et al.*, 2001). Other studies reported the effects of social factors on reproductive development (Fiol *et al.*, 2017). In the present study, due to management conditions on the commercial rearing farm, the effect of delayed onset of estrus on age or conception rate at first breeding of RG heifers was not evaluated. However, considering the positive relationship between the number of estrus before first service and fertility of estrus (Byerley *et al.*, 1987), it would be expected a greater age at first service and lower conception rate in RG than CON heifers. Further studies would be necessary to confirm this hypothesis.

In this study, CON heifers had greater IGF-1 and glucose concentrations than RG heifers along the study, which was associated with earlier first estrus and higher cumulative estrus ratio in CON than RG heifers. In heifers, body and reproductive development are associated with changes in metabolic and endocrine parameters (Chelikani *et al.*, 2009). In fact, both IGF-I (Brickell *et al.*, 2007) and glucose have been linked to several reproductive traits, such as age at puberty and at first calving, conception rate to first breeding and fertility (Taylor *et al.*, 2004; Chelikani *et al.*, 2009). In addition, fat mobilization was greater for RG than CON heifers according to NEFA concentrations. In this sense, RG heifers probably mobilized fat (increased NEFA concentrations) to offset the more negative energy status (Adewuyi *et al.*, 2005), reflected by lower glycaemia and IGF-1 concentrations, as well as a lower BCS (Barletta *et al.*, 2017). Thus, frequently SR determined a more negative energy metabolism

associated with altered skeletal development, body reserves and a delay in the first estrus in regrouped animals.

Differences in energy metabolism between groups could indicate that the feed intake, utilization of consumed nutrients or both differed in regrouped and non-regrouped heifers. In grazing conditions, feed intake is largely determined by feeding behavior (Chilibroste *et al.*, 2007). In this sense, RG heifers ate during longer time, which was probably related to the need to cover greater energetic demands provoked by social stress. Moreover, even though RG heifers graze for a longer time across the experiment, they still had a more negative energy metabolism when compared to CON heifers, demonstrating that longer feeding time could not overcome the increased requirements, grazing was less efficient, and/or longer grazing time was also costly for RG heifers. However, when results are analyzed according to the number of SR, RG heifers spent less time eating during the initial and more time eating during the last SR. Thus, it can be argued that changes in feeding time in regrouped heifers reflect a predictive behavioral adaptation to the successive changes in their social environment. Previous reports showed no effects of SR on total daily feeding time (von Keyserlingk *et al.*, 2008; Shirmann *et al.*, 2011), but reported a short-term negative effect on feeding time in regrouped animals (von Keyserlingk *et al.*, 2008), and a decrease in the feeding rate after SR (Shirmann *et al.*, 2011). This apparent difference might be related to the moment and duration after mixing in which the recordings were done, and the feeding source, as in grazing conditions heifers might increase their feeding time easier due to the access to areas with lower density of animals, decreasing the social competition. When

the results are analyzed according to the moment of the day, RG heifers spent less time eating in the PM period during the initial SR when compared to CON heifers. Even though the pattern of social behavior was not sampling along the day, it was observed that RG heifers increased their time spent on social interactions during the last part of the day. Hence, it is possible to speculate that lower feeding time in RG heifers in the PM period was associated with an increased time allocated to stabilize the social structure of the herd.

Ruminants display different behavioral and metabolic adaptations to social stressors (Keeling and Gonyou, 2001; Bøe and Færevik, 2003; Fiol *et al.*, 2019). Regrouped heifers were less time ruminating and lying than CON heifers, as previously described in regrouped cattle (Schirmann *et al.*, 2011; Veissier *et al.*, 2001) and ewes (Sevi *et al.*, 2001). In fact, rumination time is positively associated with lying time, and lower ruminating time is expected when feeding time increases (Schirmann *et al.*, 2012), as happened in RG heifers. In addition, the pattern of rumination behavior along the study was more stable in CON than RG heifers, which may be linked to greater level of ruminal health and animal welfare in the former (Krause and Oetzel, 2006; DeVries *et al.*, 2009). Moreover, RG heifers spent more time standing than CON heifers during the first SR. Similarly, many studies determined that stressed animals reduce their rumination and lying time (Grant and Albright, 2001; Herskin *et al.*, 2004; Bristow and Holmes, 2007; Fregonesi *et al.*, 2007), and increase the time standing (Wilcox *et al.*, 2013). Beside behavioral changes, the concentrations of some metabolites that are associated to social stress were also altered in RG heifers. In this sense, urea and albumin concentrations and the albumin/globulin

ratio were lower in RG than CON heifers, which may indicate greater levels of stress in these heifers (Jazbec *et al.*, 1990; Petersen *et al.*, 2004; Celi *et al.*, 2012). Even though, other possible explanations for changes in urea concentrations cannot be discarded, including differences in protein intake (Preston *et al.*, 1965) and/or sorting level (DeVries *et al.*, 2008). Overall, both changes in behavioral pattern and metabolite concentrations might be related to greater levels of social instability and stress in frequently regrouped heifers than in non-regrouped ones.

Results related to habituation to SR are still controversial: while Raussi *et al.* (2005) reported no habituation in heifers regrouped up to 16 times, Veissier *et al.* (2001) found that calves regrouped up to 14 times spent less time lying and more time standing only during the first SR, without differences in the following SR. Differences across studies can be explained by the sexual maturity of the animals, which could affect the social behavior response to SR (Bouissou, 1977). As discussed before, as SR progressed, RG heifers were observed more time feeding than CON heifers, but ruminating and lying activities were still lower in RG than CON heifers. In addition, changes in metabolic status were evident along multiple SRs, and negative effects on skeletal development in RG heifers were observed even after the last SR. Hence, RG heifers did not habituate to frequent SR or although there might be habituated (i.e. increased feeding time in RG heifers), this was not enough to overcome the main effects of regrouping. More studies are necessary to determine if the density of animals in the paddock, but also the proportion of the herd exchanged, modify the

number of regroupings needed by the animals to reduce the negative responses.

5. Conclusions

In conclusion, frequent SR in dairy heifers negatively affected body and reproductive development, all what was associated with a poorer energetic metabolism, as well as altered ingestive and postural behavioral patterns.

Acknowledgment

The authors are grateful to Federico Silveira, Ana Ruba, Ma. José Pedrozo, Alejandro Amil (veterinary students), Juan Moreira, Luis A. Ravera, Rafael Capozzoli, Hernan Armand- Ugon (private farm), and Juan Dayuto, for help with animal handling and sampling procedures. We also thank Martin Aguerre for his help with pasture management, and Andrea Fernández and Claudia Menezes for their assistance with laboratory analysis.

Declaration of Funding

Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC-VUSP 85), Universidad de la República, Uruguay.

Ethics committee

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

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Data Availability Statement

The data that support this study will be shared upon reasonable request to the corresponding author.

References

Adewuyi AA, Gruys E, Van Eerdenburg FJCM (2005) Non esterified fatty acids (NEFA) in dairy cattle. A review. *Veterinary quarterly* **27**(3), 117-126.

Altmann J (1974) Observational study of behavior: Sampling methods. *Behaviour* **49**, 227–267.

Álvarez G (1996) Campos de recría por sistema de capitalización: una muy rentable sociedad entre ganaderos y lecheros. *Hemisferio Sur*, 27p. Available at <http://www.scielo.edu.uy/pdf/agro/v14n2/v14n2a08.pdf>. (verified 30 June 2021).

Astessiano AL, Meikle A, Fajardo M, Gil J, Mattiauda DA, Chilibroste P, Carriquiry M (2015) Metabolic and endocrine profiles and hepatic gene expression of Holstein cows fed total mixed ration or pasture with different grazing strategies during early lactation. *Acta Veterinaria Scandinavica* **57**, 70–82.

Bach A, Juaristi JL, Ahedo J (2006) Growth Effects of Regrouping Dairy Replacement Heifers with Lighter Weight and Younger Animals. *The Professional Animal Scientist* **22**, 358-361.

Bach A (2011) Associations between several aspects of heifer development and dairy cow survivability to second lactation. *Journal of Dairy Science* **94**, 1052–1057.

Barletta RV, Maturana Filho M, Carvalho PD, Del Vale TA, Netto AS, Rennó FP, Mingoti RD, Gandra JR, Mourão GB, Frickea PM, Sartori R, Madureira EH, Wiltbank MC (2017) Association of changes among body condition score during the transition period with NEFA and BHBA concentrations, milk production, fertility, and health of Holstein cows. *Theriogenology* **104**, 30-36.

Barnett JL, Hemsworth PH, Cronin GM (1993) Does intensive pig farming have a viable future? - Concerns over housing and welfare. *Proceed New Zealand Society Animal Production* **53**, 219-221.

Bøe KE, Færevik G (2003) Grouping and social preferences in calves, heifers and cows. *Applied Animal Behaviour Science* **80**, 175-190.

Bouissou M.F (1977) Etude du développement des relations de dominance-subordination chez les bovins a l'aide d'épreuves de compétition alimentaire. *Biology of Behaviour* **2**, 213–221.

Brickell JS, Bourne N, Cheng Z, Wathes DC (2007) Influence of plasma IGF-1 concentrations and body weight at 6 months on age at first calving in dairy heifers on commercial farms. *Reproduction in Domestic Animals* **42**(Suppl. 2), 118.

Bristow DJ, Holmes DS (2007) Cortisol levels and anxiety related behaviors in cattle. *Physiology & behavior* **90**, 626–628.

Byerley DJ, Staigmiller RB, Berardinelli JG, Short RE (1987) Pregnancy rates beef heifers bred either on puberal or third estrus. *Journal of animal science* **65**(3), 645-650.

Celi P, Merlo M, Barbato O, Gabai G (2012) Relationship between oxidative stress and the success of artificial insemination in dairy cows in a pasture-based system. *The Veterinary Journal* **193**, 498- 502.

Chelikani PK, Ambrose DJ, Keisler DH, Kennelly JJ (2009) Effects of dietary energy and protein density on plasma concentrations of leptin and metabolic hormones in dairy heifers. *Journal of Dairy Science* **92**, 1430-1441.

Chilibroste P, Soca P, Mattiauda DA, Bentancur O, Robinson PH (2007) Short term fasting as a tool to design effective grazing strategies for lactating dairy cattle: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **47**(9), 1075-1084.

DeVries TJ, Dohme F, Beauchemin KA (2008) Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: Feed sorting. *Journal of Dairy Science* **91**, 3958-3967.

DeVries TJ, Beauchemin KA, Dohme F, Schwartzkopf-Genswein KS (2009) Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: Feeding, ruminating, and lying behavior. *Journal of Dairy Science* **92**(10), 5067-5078.

DeVries TJ (2010) Review: Behaviour and its role in the nutritional management of the growing dairy heifer. *Canadian journal of animal science* **90**, 295–302.

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

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

Fregonesi JAC, Tucker B, Weary DM (2007) Overstocking reduces lying time in dairy cows. *Journal of Dairy Science* **90**, 3349–3354.

Grant RJ, Albright JL (2001) Effect of Animal Grouping on Feeding Behavior and Intake of Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science* **84**(E. Suppl.), E156-E163.

Greter AM, Leslie KE, Mason GJ, McBride BW, DeVries TJ (2010) Effect of feed delivery method on the behavior and growth of dairy heifers. *Journal of Dairy Science* **93**, 1668–1676.

Gupta S, Earley B, Ting STL, Crowe MA (2005) Effect of repeated regrouping and relocation on the physiological, immunological, and hematological variables and performance of steers. *Journal of animal science* **83**, 1948–1958.

Gupta S, Earley B, Nolan M, Formentin E, Crowe MA (2008) Effect of repeated regrouping and relocation on behaviour of steers. *Applied Animal Behaviour Science* **110**, 229–243.

Haydock KP, Shaw NH (1975) The comparative yield method for estimating dry matter yield of pasture. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **15**, 663-670.

Heinrichs AJ, Lammers B (1998) Monitoring dairy heifer growth. Penn State, College of Agricultural Sciences.

Herskin MS, Munksgaard L, Ladewig J (2004) Effects of acute stressors on nociception, adrenocortical responses and behavior of dairy cows. *Physiology & behavior* **83**, 411–420.

Hoffman PC (1997) Optimum Body Size of Holstein Replacement Heifers. *Journal of animal science* **75**, 836–845.

Jazbec I (1990) Klinicko Laboratorijska Diagnostika. Veterinarski Fakultet, Ljubljana.

Jensen MB, Proudfoot KL (2017) Effect of group size and health status on behavior and feed intake of multiparous dairy cows in early lactation. *Journal of Dairy Science* **100**, 9759–9768.

von Keyserlingk MAG, Olenick D, Weary DM (2008) Acute Behavioral Effects of Regrouping Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* **91**, 1011–1016.

Keeling LJ, Gonyou HW (2001) *Social Behaviour in Farm Animals*. CABI Publishing, Wallingford, UK.

Kondo S, Hurnik JF (1990) Stabilization of social hierarchy in dairy cows. *Applied Animal Behaviour Science* **27**, 287-297.

Krause KM, Oetzel GR (2006) Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Animal feed science and technology* **126**(3-4), 215-236.

Le Cozler Y, Lollivier V, Lacasse P, Disenhaus C (2008) Rearing strategy and optimizing first-calving targets in dairy heifers: a review. *Animal* **2**(9), 1393–1404.

Mialon MM, Renand G, Krauss D, Ménéssier F (2001) Genetic relationship between cyclic ovarian activity in heifers and cows and beef traits in males. *Genetics Selection Evolution* **33**(3), 273.

Moberg GP, Mench JA (2000) *The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare*. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, U.K.

Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PMH (2004) Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary research* **35**, 163–187.

Preston RL, Schnakenberg DD, Pfander H (1965) Protein Utilization in Ruminants I. Blood urea nitrogen as affected by protein intake. *The Journal of Nutrition* **86**, 281-288.

Proudfoot K, Habing G (2015) Review: Social stress as a cause of diseases in farm animals: Current knowledge and future directions. *The Veterinary Journal* **206**, 15-21.

Raussi S, Boissy A, Delval E, Pradel P, Kaihilahti J, Veissier I (2005) Does repeated regrouping alter the social behaviour of heifers?. *Applied Animal Behaviour Science* **93**, 1–12.

Sejrsen K, Purup S (1997) Influence of Prepubertal Feeding Level on Milk Yield Potential of Dairy Heifers: a review. *Journal of animal science* **75**, 828-835.

Schank JC, Koehnle TJ (2009) Pseudoreplication is a pseudoproblem. *Journal of comparative psychology* **123**(4), 421.

Schirmann K, Chapinal N, Weary DM, Heuwieser W, von Keyserlingk MAG (2011) Short-term effects of regrouping on behavior of prepartum dairy cows. *Journal of Dairy Science* **94**, 2312-2319.

Schirmann K, Chapinal N, Weary DM, Heuwieser W, von Keyserlingk MAG (2012) Rumination and its relationship to feeding and lying behavior in Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science* **95**, 3212–3217.

Sevi A, Taibi L, Albenzio M, Muscio A, Dell'Aquila S, Napolitano F (2001) Behavioral, adrenal, immune, and productive responses of lactating ewes to regrouping and relocation. *Journal of animal science* **79**, 1457- 1465.

Taylor VJ, Beever DE, Bryant MJ, Wathes DC (2004) First lactation ovarian function in dairy heifers in relation to prepubertal metabolic profiles. *Journal of Endocrinology* **180**, 63-75.

Veissier I, Boissy A, dePassillé AM, Rushen J, van Reenen CG, Roussel S, Andanson S, Pradel P (2001) Calves' responses to repeated social regroupings and relocation. *Journal of animal science* **79**, 2580-2593.

Wilcox CS, Schutz MM, Rostagno MR, Lay DC Jr., Eicher SD (2013) Repeated mixing and isolation: measuring chronic, intermittent stress in Holstein calves. *Journal of Dairy Science* **96**, 7223–7233.

Young ME (2018). A place for statistics in behavior analysis. *Behavior Analysis: Research and Practice* **18**(2), 193.