



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

**“EFECTO DEL NÚMERO DE ORDEÑES SOBRE EL DESEMPEÑO
PRODUCTIVO, LA COMPOSICIÓN DE LA LECHE Y LA SALUD DE LA
GLÁNDULA MAMARIA EN VACAS LECHERAS HOLSTEIN PRIMÍPARAS EN
INICIO DE LACTANCIA”**

por

ALFONSO OLIVERA, Elsa
PRIETO MEONI, Enrique
SILVA GARCÍA, Gabriela

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: Producción Animal

MODALIDAD: Ensayo Experimental

MONTEVIDEO
URUGUAY
2015

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de Grado aprobada por:

Presidente de Mesa:

Dra. Analía Pérez

Segundo Miembro (tutor):

Dra. Cecilia Cajarville

Tercer Miembro:

Dra. Elena de Torres

Cuarto Miembro:

Fecha:

_____ 18 de diciembre de 2015 _____

Autores:

Br. Elsa Alfonso Olivera

Br. Enrique Prieto Meoni

Br. Gabriela Silva García

AGRADECIMIENTOS

Queremos brindar nuestros sinceros agradecimientos a nuestra tutora y co-tutora, Dra. Cecilia Cajarville y Alsiane Capelesso por la dedicación, confianza y el respaldo brindado hacia nosotros.

A todos los integrantes de la Unidad de Lechería de INIA La Estanzuela por la ayuda y la dedicación día a día durante todo el período experimental y quienes permitieron que este ensayo sea llevado a cabo. También a la Facultad de Veterinaria por habernos brindado las herramientas necesarias para nuestra formación como futuros profesionales y al Departamento de Bovinos y Nutrición Animal por la ayuda brindada en la elaboración de la tesis.

A nuestras familias y amigos que nos ayudaron y brindaron su apoyo durante toda la carrera universitaria, lo que ha sido de fundamental importancia para desarrollarnos como seres humanos y futuros profesionales.

Queremos también agradecerle a todos los compañeros que formaron parte de este trabajo experimental: Nicolás Amaro, Martín Cabrera, Andrea Ferreira y Ernestina Olhagaray. Y también a todos los amigos que nos regaló la facultad.

A todos muchas gracias!

TABLA DE CONTENIDO

Página

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	6
RESUMEN.....	7
SUMMARY	8
INTRODUCCIÓN.....	9
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	10
Período de transición y balance energético de los animales mantenidos con un ordeño diario:	10
Producción de leche en vacas con un ordeño diario:.....	11
Composición de la leche en vacas ordeñadas una vez al día:.....	12
Salud de la glándula mamaria en vacas ordeñadas una vez al día:.....	12
HIPÓTESIS	13
OBJETIVO GENERAL.....	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
MATERIALES Y MÉTODOS	14
Ubicación y período experimental:	14
Diseño experimental:.....	14
Manejo de los animales:.....	15
Alimentación:.....	15
Mediciones:	16
Análisis Estadístico:	16
RESULTADOS	18
Producción y composición de la leche:	18
Salud de la glándula mamaria:.....	21
DISCUSIÓN.....	24
Producción de Leche:.....	24
Composición de la leche:	25

Salud de la glándula mamaria:.....	26
CONCLUSIÓN.....	27
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	278

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Página

Tabla 1 Ingredientes (% MS) de las dietas de los animales en pre y posparto.....	16
Tabla 2 Media y desvío estándar de los valores originales de producción y composición de la leche, entre los animales mantenidos con un ordeño diario (T1) y dos ordeños diarios (T2), durante el período de tratamiento y residual.....	19
Tabla 3 Media y desvío estándar de los valores de salud de la glándula mamaria, entre los animales mantenidos con un ordeño diario (T1) y dos ordeños diarios (T2), durante el período de tratamiento y residual.....	22
Figura 1 Media y desvío estándar de producción de leche medida en litros por día (PL) y leche corregida al 4% de grasa (LCG) entre los animales mantenidos en un ordeño (T1) y dos ordeños diarios (T2) durante los primeros 56 días de lactancia y su estudio residual hasta el día 90 de lactación.....	20
Figura 2 Media y desvío estándar de los componentes de la leche; A, % de grasa (%G); B, kg de grasa (G); C, % de proteína (%P); D, kg de proteína (P); E, % lactosa (%LAC); F, kg de lactosa (LAC), entre los animales mantenidos con un ordeño (T1) y dos ordeños diarios (T2) durante los primeros 56 días de lactancia y su estudio residual hasta el día 90 de lactación.....	20
Figura 3 Media y desvío estándar de los valores de recuento de células somáticas (RCS) medido en células por mililitro, entre los animales mantenidos en un ordeño diario (T1) y dos ordeños (T2) durante los primeros 56 días de lactancia y su estudio residual hasta el día 90 de lactación.....	23
Figura 4 Media y desvío estándar de los valores de conductividad entre los animales mantenidos en un ordeño diario (T1) y dos ordeños (T2) durante los primeros 56 días de lactancia y su estudio residual hasta el día 90 de lactación.....	23

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue comparar el efecto de realizar uno o dos ordeños, durante los primeros 56 días de lactación, en la producción y composición de la leche, así como también en la salud de la glándula mamaria. Se utilizaron 20 vacas primíparas de raza Holstein las cuales fueron agrupadas en bloques al azar según fecha de parto, peso vivo y espesor de grasa subcutánea (EGS), asignándoles luego uno de los dos tratamientos aleatoriamente: T1, aplicación de un ordeño diario y T2 dos ordeños diarios, realizados ambos durante los primeros 56 días de lactación. Ambos grupos fueron mantenidos con la misma alimentación. Luego del período de aplicación del tratamiento, todos los animales fueron ordeñados dos veces al día, para el estudio residual del efecto del tratamiento, hasta el día 90 de lactación. Los resultados fueron analizados mediante PROC. MIXED de SAS, como medidas repetidas en el tiempo. Aplicar un ordeño diario al inicio de la lactancia, resultó en menor producción de leche, en el período de tratamiento y residual, con 38,1 ($p < 0,001$) y 15,2% ($p = 0,086$) respectivamente. En cuanto a composición, el porcentaje de grasa fue mayor en las vacas ordeñadas una vez al día tanto en el período de aplicación del tratamiento como en el residual. Los promedios para el T1 fueron 4,88 y 3,49% mientras que en el grupo T2 los valores fueron de 3,74 y 3,09% para el período de tratamiento y residual, respectivamente. En lo que respecta al porcentaje de proteína, la aplicación del tratamiento no resultó en diferencias significativas entre los grupos. El porcentaje de lactosa fue menor en las vacas ordeñadas una vez al día, siendo el mismo de 4,78 % y en las vacas ordeñadas dos veces 5,07%. Luego, durante el período residual los valores tendieron a ser menores para el grupo T1 ($p = 0,065$). Para la composición en kg de proteína, grasa y lactosa, los valores fueron significativamente menores para el grupo ordeñado una vez al día ($p < 0,001$, $p = 0,009$, $p < 0,001$). Las vacas ordeñadas una vez al día tuvieron mayor recuento de células somáticas (RCS) en leche, tanto en el período de aplicación del tratamiento como en el residual (266,3 cel/ml $p = 0,008$; 354,7 cel/ml $p = 0,03$). Sin embargo, la conductividad eléctrica de la leche no presentó diferencias significativas entre los tratamientos. Se puede concluir que la aplicación de un ordeño diario al inicio de la lactancia, disminuye la producción de leche y el contenido en kg de sólidos, pudiendo presentar un efecto residual a lo largo de la lactancia.

SUMMARY

The objective of this work was to compare the effects of making one or two milkings, during the first 56 days of lactation, in terms of production and milk composition and regarding the mammary gland's health. There were used 20 primiparous Holstein cows which were grouped in randomized blocks according to date of birth, live weight and thickness of subcutaneous fat, then randomly assigned them to one or two treatments: T1, application of one daily milking and T2 two daily milking, made both during the first 56 days of lactation. Both groups were maintained on the same diet. After the application of the treatment period, all the animals were milked twice daily, to study the residual treatment effect, until day 90 of lactation. The results were analyzed by PROC. MIXED from SAS, for repeated variables over time. Applying one daily milking in early lactation, resulted in lower milk production, in the treatment and the residual period, with 38.1 ($p<0.001$) and 15.2% ($p=0.086$) respectively. With respect of the composition, fat percentage was higher in cows milked once a day both for the period of application of the treatment as the residual. The averages for the T1 were 4.88 and 3.49% while in the group T2 values were 3.74% and 3.09% for the treatment period and the residual, respectively. Regarding to the protein percentage, the treatment application did not result in significant differences between groups. The percentage of lactose was lower in cows milked once daily, being 4.78% and in the cows milked twice a day 5.07%. Later, in the residual period, values tended to be lower for the group T1 ($p=0.065$). For the composition in kg of protein, fat and lactose, values were significantly lower for the group milked once a day ($p<0.001$, $p=0.009$, $p<0.001$). Cows milked once a day had higher somatic cell count (SCC) in milk, both in the implementation period of treatment and the residual (266.3 $p=0.008$; 354.7 $p=0.03$). However, the electrical conductivity of milk showed no significant difference between treatments. We can concluded that the application of one daily milking in early lactation, cause losses in milk production and kg of solids content in kg, and may present a residual effect throughout lactation.

INTRODUCCIÓN

En Uruguay se constata un importante cambio en la dimensión de los establecimientos lecheros medido según el volumen de leche obtenido, representando un aumento del 56% de la producción entre los años de 2004 y 2013. Otra tendencia sostenida es el incremento en el tamaño de los establecimientos lecheros, representado por el número de vacas en ordeño. Por otro lado, la superficie que ocupan dichos establecimientos muestra un descenso de 4,3% respecto al año 2012 (MGAP, 2014). Actualmente la gran mayoría de las industrias que compran leche para procesar, realizan análisis de los contenidos de grasa y proteína, además de evaluar otros parámetros de calidad de la leche como, recuentos microbianos y de células somáticas. Dado que la industria presenta un sistema de pago en función de la cantidad de grasa y proteína de la leche (con estímulos para los niveles más altos), hay una tendencia a favor de estos cambios que son parte de la mejora global del proceso de industrialización (MGAP, 2014).

Durante la lactancia temprana es cuando las vacas presentan los mayores problemas metabólicos, inducidos principalmente por el balance energético negativo. Como es conocido, realizar un solo ordeño durante un breve período de tiempo, en el inicio de la lactancia, mejora el estatus metabólico de los animales (McNamara y col., 2007). Por esta razón, resulta importante evaluar si la aplicación de este manejo altera o no de manera significativa la producción y composición de la leche, así como la salud de la glándula mamaria. Es importante para los establecimientos productores de leche, que los mismos logren, sin descuidar la salud de los animales, maximizar su producción tanto en volumen de leche como en cantidad de sólidos por litro. Esto también influye sobre la elaboración de los subproductos.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Período de transición y balance energético de los animales mantenidos con un ordeño diario:

El período de transición, es definido como las tres últimas semanas antes del parto hasta las tres semanas posparto (Grummer, 1995). El mismo está marcado por cambios en el estatus endócrino para iniciar el parto y la producción de leche, cambios que a su vez influyen en el metabolismo de los tejidos y en la utilización de los nutrientes. Es en este momento también, cuando se concentran la mayoría de las enfermedades metabólicas o tecnopatías de la producción de leche. Maximizar la producción de leche, evitar enfermedades metabólicas y asegurar la siguiente preñez, dependerá en gran parte de la forma en que la vaca enfrente el período de transición (Grummer, 1995).

El incremento en las necesidades nutricionales asociadas con la supresión del consumo, generalmente conducen a la vaca a un estado de balance energético negativo (BEN), el cual es frecuentemente observado en la última semana de gestación y en los primeros dos meses posparto. Bisinotto y col. (2012) describen que el BEN promedio en vacas lecheras en este período es de -5 Mcal de energía neta de lactación (ENI/d), lo que equivale aproximadamente a la pérdida de 1 kg de peso corporal por día, siendo la misma principalmente de tejido adiposo.

Debido al BEN al que se enfrentan los animales en el inicio de la lactación, la realización de un ordeño diario podría ser utilizado como estrategia para disminuir las demandas energéticas para lactación en este período. Sin embargo, esta medida de manejo en vacas lecheras resulta en pérdidas en la producción de leche. Las pérdidas dependen de innumerables factores como, raza, etapa de lactación, tiempo que los animales permanecen en un ordeño, y de acuerdo con Stelwagen y col. (2013) en animales de primera cría las pérdidas pueden ser mayores. Aun así, en sistemas donde se da menor énfasis a la producción de leche por vaca, un ordeño diario ofrece una alternativa práctica y viable para el manejo de los sistemas (Clark y col., 2006). Un ordeño puede reducir el estrés por calor y las patologías podales en vacas lecheras, ya que las vacas caminan menos hasta la sala de espera y permanecen menos tiempo paradas sobre el concreto esperando para ser ordeñadas (Kendall y col., 2008; O'Driscoll y col., 2010).

En cuanto a la mano de obra, los sistemas encuentran flexibilidad para el manejo y atención de otras labores realizando un solo ordeño diario suministrando más tiempo para focalizarse en otras actividades, como manejo de pasturas, detección de celo, atención de las vacas enfermas, los cuales son todos aspectos esenciales, sobre todo en un sistema de producción lechero pastoril (Bewsell y col., 2008).

El ensayo realizado por McNamara y col. (2007) concluye que reducir la frecuencia de ordeño temporalmente en la lactancia temprana de dos ordeños diarios a un ordeño diario, resulta en menores pérdidas de peso vivo y condición corporal y mejora el estado metabólico. Los autores destacan que la disminución en la demanda energética por producción de leche en régimen de un ordeño diario es más

que suficiente para compensar las pérdidas energéticas por el menor consumo de los animales en esta etapa, reduciendo el BEN en el posparto inmediato.

Producción de leche en vacas con un ordeño diario:

Resultados de producción de leche indicaron que vacas que fueron ordeñadas una vez al día durante un período de 4 semanas inmediatas al parto producían 500 a 600 kg menos de leche en toda la lactancia, comparadas con aquellas ordeñadas dos veces al día en el mismo periodo (McNamara y col., 2007). También Remond y col. (1999) encontraron que las vacas ordeñadas una vez al día por un período de tiempo de 3 y 6 semanas posparto, produjeron respectivamente entre 25 y 40% menos de leche que las vacas ordeñadas dos veces diarias.

De acuerdo con Stelwagen y col. (2013) la pérdida de la producción de leche en vacas ordeñadas una vez al día, podría deberse a la disminución de la habilidad secretora de la glándula mamaria, más que a una reducción en el número de células secretoras (Davis y col., 1998; Chedly y col., 2012). Los autores demostraron que largos períodos de realización de un ordeño podría resultar en una disminución sostenida de células secretoras. La evidencia indica que tanto realizando un ordeño diario como ordeños incompletos durante un tiempo sostenido promueven la regresión de la glándula ya que pierde su capacidad funcional (Littlejohn y col., 2009).

La disminución en la capacidad secretoria, está regulada por factores referidos a la acumulación de leche en la glándula, como: el grado y duración de la distensión alveolar, la permeabilidad de las uniones ocluyentes entre las células epiteliales y el flujo sanguíneo mamario, así como por la reducción en la actividad metabólica del tejido secretor, debido a la baja actividad de enzimas mamarias (Davis y col., 1998). A esto se suman los hallazgos de Littlejohn y col. (2009), quienes registraron cambios en la expresión de genes involucrados en la producción de leche en vacas ordeñadas una vez al día, en contraste con dos ordeños.

La disminución en la producción de leche puede ser explicada por numerosos eventos intramamarios que suceden cuando existe una acumulación de leche en la glándula por un período de 24 horas. Debido a la distensión alveolar causada por esta acumulación, las células epiteliales sufren cambios tanto morfológicos como funcionales que conducen a un aumento de la permeabilidad de las uniones ocluyentes (Davis y col., 1998). Dichas uniones, son estructuras celulares que facilitan la comunicación entre las células y son importantes para mantener la estructura tridimensional del epitelio (Stelwagen y Singh, 2013), así como para prevenir que los componentes del suero sanguíneo pasen a la leche y viceversa (Stelwagen y col., 1993). Aunque la disrupción de estas uniones se da en forma transitoria, en el ensayo realizado por Chedly y col. (2012) la disminución en la producción de leche persistió durante las 5 semanas de aplicación de un ordeño. Por lo tanto, este fenómeno no sería esencial para la inhibición de la síntesis de leche que se observa al aplicar un ordeño diario. Aun así, no se puede descartar la posibilidad de que dicha disrupción observada al inicio de un ordeño, podría iniciar la regulación celular que induce la inhibición de la síntesis de leche (Chedly y col., 2012).

Composición de la leche en vacas ordeñadas una vez al día:

Comparado con dos ordeños diarios, el ordeñar las vacas una vez al día durante un corto período de tiempo, causa cambios significativos en la concentración de los componentes de la leche (Davis y col., 1998). Aplicar un ordeño diario durante las primeras 10 semanas luego del parto, disminuye la producción de sólidos en un 27% con subsecuentes efectos residuales que rondan entre 10 y 15% menos de sólidos totales comparado con las vacas ordeñadas dos veces al día desde el inicio del parto (Phyn y col., 2010). La producción de leche, la cantidad de sólidos, de grasa, de proteína y de lactosa para vacas ordeñadas una vez al día durante cuatro lactancias completas fueron menores en comparación con las vacas ordeñadas dos veces (Clark y col., 2006). Remond y col. (2004) observaron que la concentración de grasa y proteína durante toda la lactación, fueron significativamente mayores en las vacas ordeñadas una vez al día. Este aumento se explica parcialmente por la menor producción de leche en estas vacas. De esta forma, las cantidades secretadas de grasa y proteína resultaron en 25 y 26% menos respectivamente, comparadas con las vacas ordeñadas dos veces al día. El aumento registrado en el contenido de proteína se explica en gran parte por el aumento de la caseína. En cuanto a la lactosa no se reportó una diferencia significativa entre ambos grupos. Stelwagen y col. (2013), también encontraron que el incremento en contenido de grasa y proteína con un ordeño diario no compensa la disminución de la producción de leche, resultando en una disminución en la producción de grasa, proteína y lactosa en relación a los valores de producción obtenidos con dos ordeños.

El aumento en el contenido de proteína verdadera observado en un ordeño diario fue debido al aumento de la caseína y de proteínas del suero. El contenido de IgG 1 y de albúmina sérica aumentó en un 30 – 40%. El aumento de proteínas del suero se debe probablemente a un aumento en la permeabilidad de las uniones ocluyentes que sucede luego de un período de acumulación de leche mayor a 18 horas. La contribución de la caseína (56%) al aumento de la proteína verdadera fue por lo tanto más baja que la relación caseína/proteínas del suero en la leche, secretada por las vacas ordeñadas dos veces al día (82%). Un ordeño diario resultó en una disminución de la relación caseína/proteínas del suero de un 1.8 % de promedio (Remond y Pomies, 2005).

Muchos de los cambios en la composición de la leche pueden ser debidos a cambios en la permeabilidad de las uniones ocluyentes entre las células epiteliales secretoras, dando lugar a un mayor intercambio entre la leche y el fluido intersticial. La concentración de lactosa usualmente decrece con un ordeño diario. Esta disminución, indica un aumento en el flujo de salida de la misma desde la glándula mamaria por medio de las uniones ocluyentes las cuales están más débiles. La cantidad de lactosa que se escapa fuera de la glándula representa una cantidad de leche que equivale a aproximadamente el 20% de la pérdida de leche observada con un ordeño diario (Davis y col., 1998).

Salud de la glándula mamaria en vacas ordeñadas una vez al día:

Disminuir la frecuencia de remoción de la leche puede tener efectos adversos en la salud de la glándula mamaria (Stelwagen y col., 2013). Autores citan que el recuento de células somáticas (RCS) fue consistentemente elevado con manejo de un ordeño

diario comparado con dos ordeños diarios. Lo mismo puede ser debido al efecto de concentración que se manifiesta por la menor producción de leche (Stelwagen y col., 1994; Kelly y col., 1997; O'Brien y col., 2001; Clark y col., 2006). Este aumento en el recuento celular estaría ligado a la disrupción de la integridad de las uniones ocluyentes entre las células epiteliales de la glándula mamaria (Stelwagen y col., 1994). Estas uniones juegan un rol importante en la respuesta inmune ya que permiten el pasaje de citoquinas y neutrófilos provenientes de la sangre a la luz alveolar (Stelwagen y Singh, 2013).

Es de suma importancia resaltar, que el incremento del RCS no necesariamente está asociado con un aumento de casos de mastitis (Stelwagen y col., 2013). Aun así la acumulación de leche en la glándula, al omitir un ordeño, promueve la proliferación de microorganismos alrededor del orificio del pezón y puede existir mayor riesgo de contraer mastitis (Remond y col., 2002). Algunos trabajos indican que las vacas ordeñadas una vez al día no presentan mayor incidencia de la enfermedad clínica, y la concentración de células somáticas puede ser controlada en estas vacas si al inicio de la lactancia se encuentran con ubres libres de infecciones bacterianas (Lacy-Hulbert y col., 2005).

La conductividad eléctrica es comúnmente usada como indicador de salud de la glándula mamaria. Los cambios en la concentración de iones en la leche mastítica causan un incremento de la conductividad eléctrica, por encima de 4,6 mS/cm aproximadamente (Brandt y col., 2009). En lo que a esto respecta, la conductividad está determinada por la concentración de aniones y cationes (principalmente Na⁺, K⁺ y Cl⁻). A través de las uniones ocluyentes, el sodio y el cloro fluyen hacia la leche y el potasio y la lactosa son desplazados al fluido extracelular. Cuando las vacas son expuestas a una infección intramamaria, la conductividad eléctrica de la leche se incrementa debido a un aumento de la concentración de sodio y cloro en la leche. Este incremento es causado por una destrucción de las uniones ocluyentes y la activación del sistema de bombeo de iones (Janzekovic y col., 2009).

En base a todo esto la realización de un ordeño diario durante el inicio de la lactancia, si bien tendría efectos negativos sobre la producción y composición de la leche de esa lactancia, tendría un efecto positivo sobre el BEN, favoreciendo el estado metabólico y no afectaría la salud de la glándula. De este modo, el presente trabajo estudiará el efecto de realizar uno o dos ordeños en el desempeño productivo, en la composición de la leche y salud de la glándula mamaria de vacas de primera cría.

HIPÓTESIS

Realizar un solo ordeño en vaquillonas de primer cría al inicio de la lactancia disminuye el volumen de leche, modifica la composición de la misma y altera la salud de la glándula mamaria, con respecto a la realización de dos ordeños diarios en el mismo período de la lactancia.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de realizar uno y dos ordeños en el desempeño productivo de vaquillonas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar la producción de leche diaria en vaquillonas mantenidas en régimen de uno o dos ordeños diarios al inicio de la lactancia, durante los primeros 56 días de lactancia y hasta el día 90 de lactación.

Evaluar si la aplicación de un ordeño diario afecta la concentración de: grasa, proteína, lactosa, caseína y urea de la leche, tanto durante el período de aplicación del tratamiento como el residual.

Evaluar el estado de salud de la glándula mamaria en vaquillonas ordeñadas una o dos veces al día en los mismos períodos de tiempo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación y período experimental:

El ensayo experimental fue realizado en la Unidad de Lechería del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA, La Estanzuela), situado en ruta 50, km 11, departamento de Colonia, República Oriental del Uruguay (34° 20' S, 57° 41' W; 81 m.s.n.m), en el período comprendido entre los meses de febrero a julio del 2014.

Diseño experimental:

Para el ensayo se utilizaron 20 vacas primíparas de raza Holstein con peso vivo de 594,7 kg \pm 57,2 kg, espesor de grasa subcutánea 0,40 mm \pm 0,18 mm y condición corporal 3,6 \pm 0,8 (media \pm DE). Las mismas fueron agrupadas en bloques al azar de acuerdo a la fecha del parto, peso vivo, espesor de grasa subcutánea y condición corporal, al día -28 del inicio de los partos.

Los animales fueron agrupados en dos tratamientos de uno o dos ordeños diarios, utilizando la misma dieta tanto en composición como en cantidad. Los tratamientos consistieron en:

Tratamiento 1 (T1) - un ordeño diario durante los primeros 56 días de lactación (a las 05:30 h.).

Tratamiento 2 (T2) - dos ordeños diarios durante los primeros 56 días de lactación (a las 05:30 y a las 16:00 h.).

El tratamiento se inició al cuarto día posparto, en la sala de ordeño no se brindó alimento. Los animales del T1 durante el ordeño de la tarde permanecían en una zona sin acceso a comida. Luego del período de aplicación del tratamiento (56 días

posparto) todos los animales fueron ordeñados dos veces al día hasta el día 90 de lactación, para el estudio del efecto residual del tratamiento.

Manejo de los animales:

Previo al parto:

En todas las vacas se determinó, al día -28 del inicio del parto, peso vivo, condición corporal y espesor de grasa subcutánea, con el objetivo de conformar grupos experimentales homogéneos.

Para la determinación del peso vivo se utilizó balanza electrónica y la condición corporal se evaluó por observación directa, siempre por el mismo observador como fue descrito por (Edmonson y col., 1989).

El espesor de grasa subcutánea (EGS), fue medido mediante ultrasonografía como fue descrito por Schröder y Staufenbiel (2006), con un ecógrafo Aloka® 500 con transductor lineal de 5,0 MHz de frecuencia.

Posparto:

Para los ordeños de la mañana todos los animales eran llevados al tambo y ordeñados. Para el ordeño vespertino, los animales fueron manejados de la siguiente manera: las vacas del T2 se apartaban y se llevaban al tambo. Finalizado el ordeño vespertino los animales eran reagrupados nuevamente para el manejo de la alimentación. Las medidas corporales de peso vivo, espesor de grasa subcutánea y condición corporal se realizaron a los días 07 preparto y a los días 07, 14, 21, 28, 42, 56, 77 y 90 del posparto de igual manera que como se describió en el preparto.

Alimentación:

Durante el período preparto los animales se alimentaron exclusivamente con ración totalmente mezclada (RTM). En el posparto, se les ofreció una dieta para alcanzar una producción media de 30 litros de leche/vaca/día, formulada de acuerdo con las exigencias descritas en el NRC (2001). La fórmula se realizó considerando los nutrientes aportados por la RTM y por el pastoreo de avena, estimando un consumo diario de pastura de 10 kg de materia seca (MS) para llegar a cubrir los requerimientos para esa producción.

La dieta consistió en 70% RTM suministrada en comederos luego del ordeño de la mañana y 30% pastura compuesta por avena variedad Halley la que pastoreaban entre el ordeño de la tarde y el de la mañana (Tabla 1).

Para el pastoreo los animales ingresaban diariamente a parcelas nuevas, realizadas para ofertar la cantidad de MS de pastura que se estableció y asumiendo una utilización del 50%. Durante el mismo los animales contaron con agua en las parcelas. La asignación de los animales dentro de las parcelas se realizó respetando el delineamiento de los bloques, asignando dos animales del mismo tratamiento en cada parcela.

El consumo de materia seca (CMS) entre los grupos experimentales no presentó diferencias significativas, siendo el promedio para el período de tratamiento de 19,4 kg MS y 17,7 kg MS para el período residual.

Tabla 1 - Ingredientes (% MS) de las dietas de los animales en pre y posparto

Ingrediente	Dieta	
	Preparto	Posparto
Pastoreo		
Avena Halley RTM ¹	-	30,02
Silo de Maíz	84,03	35,52
Silo de Maíz Grano Húmedo	4,62	27,01
Harina de Soja	6,15	5,25
Fardo de Trigo	4,62	*2
Úrea ³	0,15	0,35
Vitaminas y Minerales	0,43 ⁴	1,85 ⁵

¹ Ración totalmente mezclada

² Adicionado dos kilogramos a la dieta posparto posterior a las tres semanas del parto

³ Suministrada en forma de degradación lenta (Optigen)

⁴ Sal (0,03% MS), BoviMilk PreParto Nutral (0,40 % MS)

⁵ Sal (0,03% MS), Bicarbonato de Sodio (0,19 % MS), Carbonato de Sodio (0,19 % MS), Bovimilk k-Premium Nutral (0,26 % MS)

Mediciones:

Producción de leche:

La producción de leche se registró de forma automática (software DairyPlan) en todos los ordeños durante el período experimental (12 semanas).

Composición, calidad de la leche y salud de la glándula mamaria:

Para la determinación de la composición y calidad de la leche, se colectaron muestras de cada animal representativas de cada ordeño, dos veces a la semana. Las muestras de leche fueron analizadas para la determinación de proteína, grasa, lactosa, alfa-caseína y urea, mediante espectroscopía infrarroja (FT120, Foss Electric, Hillerød, Denmark), y el recuento de células somáticas se determinó por medio de un contador (Fossomatic, Foss Electric). Para la determinación de la conductividad eléctrica de la leche se utilizó el equipo ORION modelo 105, las muestras fueron colectadas de cada animal dos veces a la semana y colocadas en tubos sin conservante.

Análisis Estadístico:

Los datos (frecuencia de ordeño) se compararon entre tratamientos como medidas repetidas sobre el mismo animal, utilizando el procedimiento Proc. Mixed del software SAS[®] (2002) utilizando una estructura de covarianza tipo AR(1) como el modelo descrito a seguir:

$$y_{ijk} = \mu + T_i + D_j + B_k + (T \cdot D)_{ij} + (B \cdot T)_{ki} + \varepsilon_{ijk}, \quad i = 1, \dots, a; j = 1, \dots, b; k = 1, \dots, n$$

Donde;

y_{ijk} = Observación ijk

μ = Media general

T_i = Efecto fijo del tratamiento i

D_j = Efecto fijo del día j

B_k = Efecto fijo del bloque k

$(T \cdot D)_{ij}$ = Efecto fijo interacción tratamiento i por día j

$(B \cdot T)_{ki}$ = Error aleatorio a, (Interacción bloque k con el tratamiento i)

ε_{ijk} = Error aleatorio b, (Variación entre las medidas en los animales)

a = número de tratamientos; b = número de días; n = número de bloque

Previo al análisis estadístico, se verificó la normalidad de los residuos mediante el uso del Proc Univariate para el procedimiento Proc Mixed de SAS y se eliminaron los valores extremos (uno a ocho valores). Las medias de todos los parámetros evaluados fueron comparadas mediante el test t de Student. Se declaran como diferencias significativas cuando $P \leq 0,05$ y $0,05 < P < 0,10$ fueron considerados como tendencias.

RESULTADOS

Producción y composición de la leche:

Durante el período de tratamiento la producción de leche (PL) en litros por día (l/día) y en litros corregidos por grasa (LCG) fueron afectados por el tratamiento. Se registró una disminución en la producción de leche de 38,1%, siendo 15,0 litros el promedio para el grupo ordeñado una vez al día y 24,2 litros para las vacas ordeñadas dos veces (Tabla 2, Figura 1). En el período residual la PL tendió a ser menor en el T1, siendo la producción de leche 15,2% menor en las vacas ordeñadas una vez al día ($p=0,086$).

Durante el período de tratamiento; el porcentaje de grasa fue significativamente mayor para el T1 comparado con el T2 (4,88% y 3,74% respectivamente). La lactosa fue menor en el T1 observándose efecto solamente del tratamiento (Tabla 2, Figura 2). Los kg de grasa, proteína y lactosa tuvieron diferencias significativas tanto por el efecto tratamiento, día, como interacción TxD, siendo menores para los animales del grupo T1 (Tabla 2, Figura 2).

En el período residual el tratamiento afectó el porcentaje de grasa. El mismo fue significativamente mayor en los animales del T1 con respecto a los animales ordeñados dos veces al día ($p<0,05$).

El porcentaje de lactosa tendió a ser menor en las vacas ordeñadas una vez al día ($p=0,065$).

Así mismo durante este período los kg de proteína tendieron a ser menores para el grupo T1 y la lactosa fue significativamente menor ($p= 0,074$, $p=0,032$ respectivamente; Tabla 2).

Tabla 2. Media y error estándar de los valores de producción y composición de la leche, para los animales mantenidos con un ordeño diario (T1) y dos ordeños diarios (T2), durante el período de tratamiento y residual.

Variable	Período Tratamiento ¹						Período Residual ²					
	Promedios			P -valor ³			Promedios			P - valor		
	T1 ⁴	T2 ⁵	EE ⁶	T	D	T*D	T1	T2	EE	T	D	T*D
PL, l/d ⁷	15,0	24,2	0,17	<0.001	<0.001	<0.001	22,2	26,2	0,32	0,0868	<0.001	0,3742
LCG,kg/d ⁸	17,1	22,8	0,23	<0.001	<0.001	<0.001	20,7	22,6	0,31	0,2041	<0.001	0,9969
Grasa, %	4,88	3,74	0,07	<0.001	0,0412	0,7296	3,49	3,09	0,05	0,0427	0,1825	0,9334
Proteína, %	3,35	3,34	0,01	0,5909	<0.001	0,1658	3,41	3,27	0,02	0,2158	0,1008	0,9785
Lactosa, %	4,78	5,07	0,02	<0.001	0,1517	0,1371	5,02	5,13	0,02	0,0656	0,4289	0,5301
Caseína, %	2,58	2,59	0,01	0,7683	<0.001	0,3302	2,67	2,59	0,02	0,3994	0,0480	0,9248
Grasa, kg/d	0,74	0,88	0,01	<0.001	0,0007	0,0967	0,79	0,81	0,01	0,7209	<0.001	0,9837
Proteína, kg/d	0,50	0,80	0,01	<0.001	<0.001	<0.001	0,75	0,86	0,01	0,0740	<0.001	0,5995
Lactosa, kg/d	0,72	1,23	0,01	<0.001	<0.001	<0.001	1,11	1,35	0,02	0,0323	<0.001	0,1419
Urea, mgN/dL	11,8	10,9	0,23	0,2570	0,0242	0,8278	8,9	8,5	0,29	0,6200	0,4580	0,7857

¹Período Tratamiento: período de aplicación del tratamiento, hasta el día 56 de lactación.

²Período Residual: período residual de evaluación de la aplicación del tratamiento, entre el día 57 y 90 de lactación.

³P: Nivel de significancia para efecto de tratamiento (T), día (D) e interacción tratamiento día (T*D)

⁴T1: Tratamiento uno, vacas ordeñadas una vez al día durante los primeros 56 días de lactación.

⁵T2: Tratamiento dos, vacas ordeñadas dos veces al día desde el inicio de la lactación.

⁶EE: Error estándar de las medias.

⁷PL, l/d: Producción de leche (l/d).

⁸LCG, kg/d: Leche corregida por grasa 4%, $LCG\ 4\% = 0,4 * PL + 15 * kg\ grasa * PL$ (NRC, 2001).

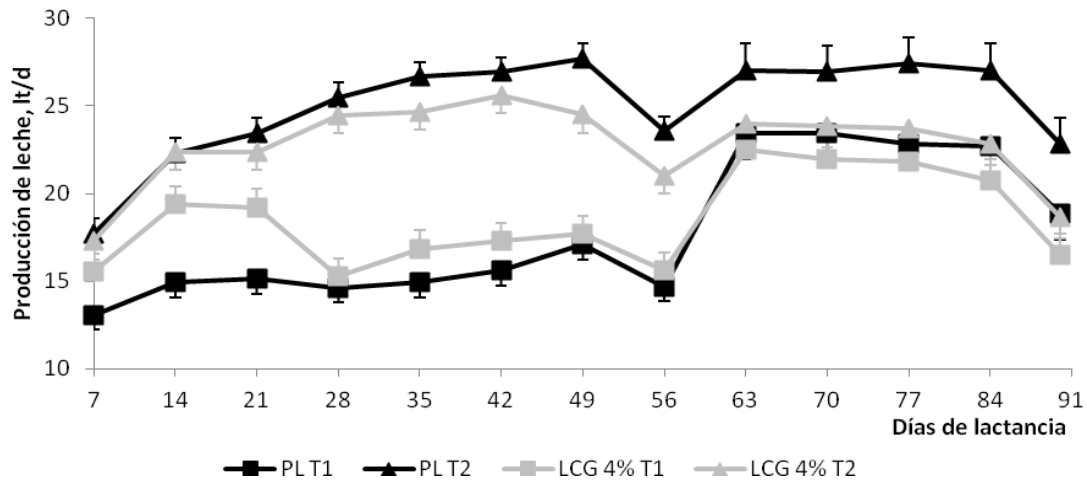


Figura 1. Media y desvío estándar de producción de leche medida en litros por día (PL) y leche corregida al 4% de grasa (LCG 4%) para los animales mantenidos en un ordeño diario (T1) y dos ordeños diarios (T2) durante los primeros 56 días de lactancia y su estudio residual hasta el día 90 de lactación.

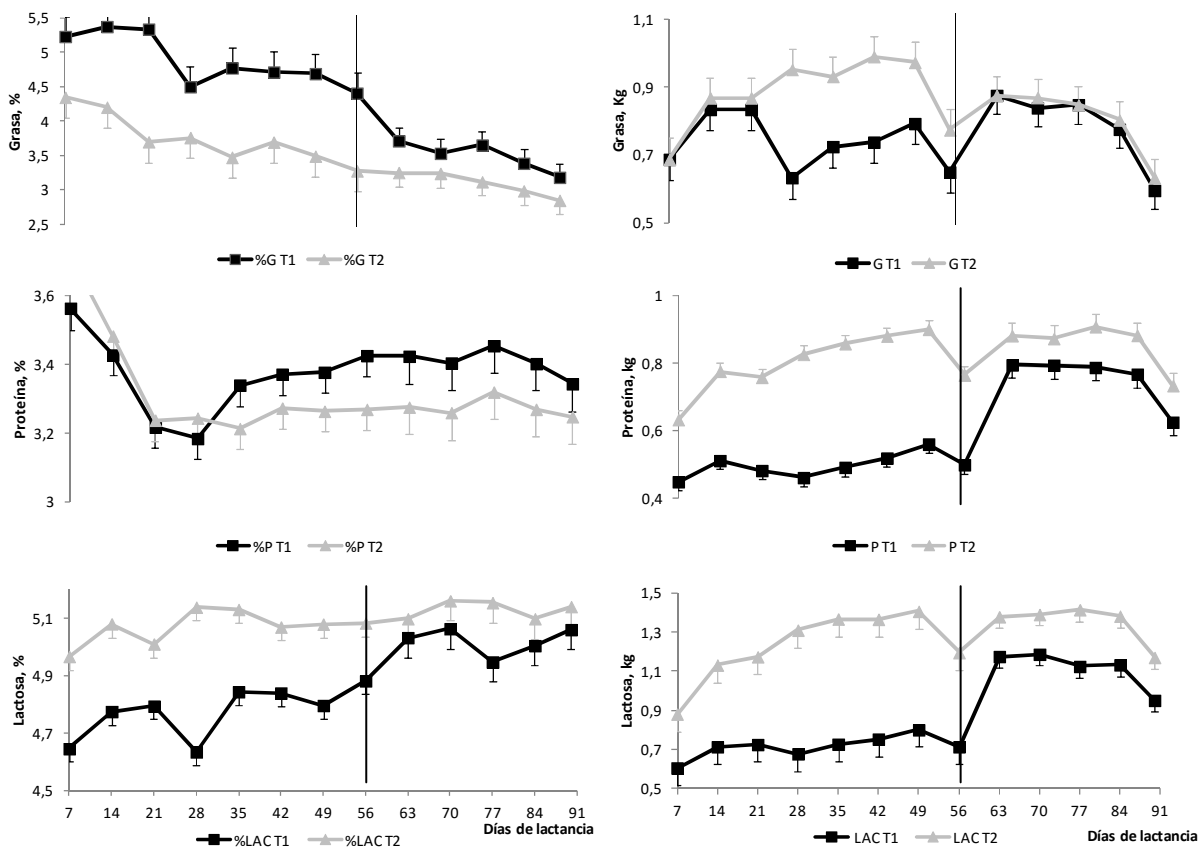


Figura 2. Media y desvío estándar de los componentes de la leche; A, % de grasa (%G); B, kg de grasa (G); C, % de proteína (%P); D, kg de proteína (P); E, % lactosa (%LAC); F, kg de lactosa (LAC), para los animales mantenidos con un ordeño diario (T1) y dos ordeños diarios (T2) durante los primeros 56 días de lactancia y su estudio residual hasta el día 90 de lactación.

Salud de la glándula mamaria:

El RCS expresada en células por mililitro (cel/ml) durante el período de aplicación del tratamiento fue 266,3 para el T1 y 95,3 para los animales del T2, indicando un diferencia significativa ($p=0,008$) entre los grupos (Tabla 3, Figura 3). En el período residual también se manifestó un incremento del RCS para el grupo T1 ($p=0,03$).

La conductividad no presentó diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 3, Figura 4).

Tabla 3. Media y error estándar de las características relacionadas a la salud de la glándula mamaria, entre los animales mantenidos con un ordeño diario (T1) y dos ordeños diarios (T2), durante el período de tratamiento y residual.

Variable	Período Tratamiento ¹						Período Residual ²					
	Promedios			P valor ³			Promedios			P valor		
	T1 ⁴	T2 ⁵	EE ⁶	T	D	T*D	T1	T2	EE	T	D	T*D
RCS, cel/ml ⁷	266,3	95,3	13,68	0,0080	0,0025	0,3861	354,7	67,2	25,88	0,0308	0,5135	0,4694
Conductividad, mS	4,74	4,63	0,03	0,4083	0,1666	0,2895	4,83	4,78	0,03	0,7429	0,0472	0,6572

¹Período Tratamiento: período de aplicación del tratamiento, hasta el día 56 de lactación.

²Período Residual: período residual de evaluación de la aplicación del tratamiento, entre el día 57 y 90 de lactación.

³P: Nivel de significancia para efecto de tratamiento (T), día (D) e interacción tratamiento día (T*D).

⁴T1: Tratamiento uno, vacas ordeñadas una vez al día durante los primeros 56 días de lactación.

⁵T2: Tratamiento dos, vacas ordeñadas dos veces al día desde el inicio de la lactación.

⁶EE: Error estándar de las medias.

⁷RCS: Recuento de células somáticas, medido en células por mililitro de leche (cel/ml).

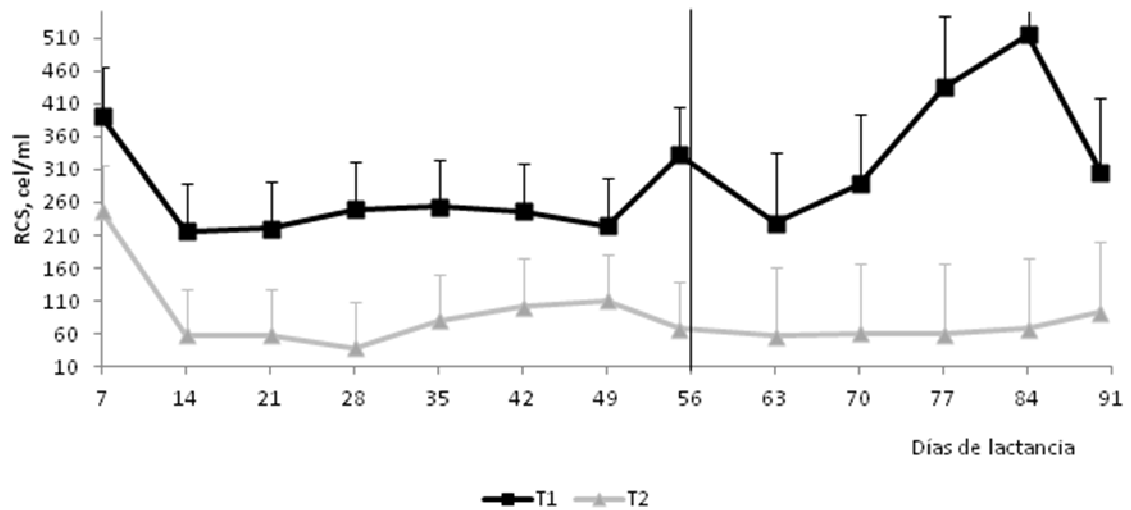


Figura 3. Media y desvío estándar de los valores de recuento de células somáticas (RCS) medido en células por mililitro, para los animales mantenidos en un ordeño diario (T1) y dos ordeños (T2) durante los primeros 56 días de lactancia y su estudio residual hasta el día 90 de lactación.

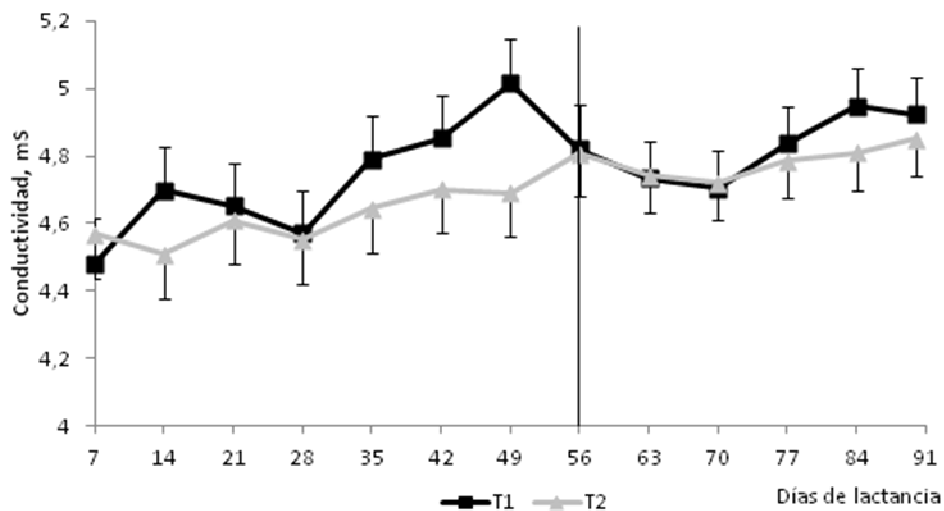


Figura 4. Media y desvío estándar de los valores de conductividad para los animales mantenidos en un ordeño diario (T1) y dos ordeños (T2) durante los primeros 56 días de lactancia y su estudio residual hasta el día 90 de lactación.

DISCUSIÓN

Producción de Leche:

Como fue planteado en la hipótesis, ordeñar las vacas una vez al día durante los primeros 56 días posparto disminuyó significativamente la producción de leche respecto a las vacas ordeñadas dos veces al día, esto se dio en un 38,1%. En el presente ensayo también se observa como al disminuir la frecuencia de ordeño, en el período de aplicación del tratamiento, se alteró la distribución típica de la curva de lactancia evidenciado por la interacción tratamiento/día (Figura 1).

Ensayos anteriores indican una reducción inmediata en la producción de leche, cuando las vacas comienzan a ser ordeñadas una vez al día, independientemente de la duración en que se aplique este tipo de manejo (Stelwagen y col., 2013). Estudios revelan que el intervalo entre ordeños, debe ser menor a 18 h para evitar efectos adversos tanto en la producción como en la calidad de la leche (Stelwagen, 2001). Phyn y col. (2010) mencionan en su revisión que realizar un solo ordeño posparto disminuye la producción de leche inmediatamente en un 20%, aumentando estas pérdidas entre un 30 y 50% tanto como se extienda la duración de la aplicación de un ordeño diario (Rémond y col., 1999; 2002; 2004, citado por Phyn col., 2010). Este tipo de manejo puede resultar en efectos negativos en la subsecuente producción de leche al empezar a realizar dos ordeños diarios, particularmente si se aplica por períodos mayores a 3 semanas posparto (Rémond y col., 1999; McNamara y col., 2007; Schlamberger y col., 2010 citados por Phyn col., 2010), sin embargo en los resultados desprendidos de este ensayo no sucedió de igual manera.

Esta reducción en la producción generalmente es mayor y más variable al realizar un solo ordeño durante las 4 a 5 semanas posparto, como es el caso de este experimento, que cuando se implementa en la etapa final de la lactación (Rémond & Pomiès, 2005). Sumamos que los efectos negativos de aplicar un ordeño diario pueden ser mayores en vacas primíparas, como las de este experimento, que en multíparas, aunque no hay evidencias que indiquen que la aplicación de un ordeño diario afecte la vida productiva de las vacas primíparas (Stelwagen y col., 2013).

Al igual que lo descrito por McNamara y col (2007), en este experimento al aplicar dos ordeños diarios a las vacas del T1, si bien no alcanzaron la producción de aquellas que desde el inicio se ordeñaron dos veces, igualmente expresaron un aumento numérico en el volumen de leche. También coincide con lo demostrado por Rémond y Pomiès (2005) y Stelwagen y col. (2013) quienes encontraron que cuando las vacas comienzan a ordeñarse dos veces al día, la producción de leche se recupera rápidamente (principalmente en la primer semana), pero por lo general, esta recuperación no es total. Además demuestran que breves períodos de aplicación de un ordeño diario durante la lactancia temprana, llevan a un efecto negativo sostenido en la producción de leche, aún después de empezar a ordeñar dos veces al día. Vale indicar, que el momento en que se produce el cambio de tratamiento para el grupo ordeñado

una vez al día, coincide con el pico de producción de la curva de lactancia, observándose que el mismo es menor que el de las vacas del T2.

Diferentes mecanismos fisiológicos han sido propuestos para explicar la reducción en la producción de leche inducida por la realización de un ordeño, tales como, la secreción en leche de una proteína capaz de inhibir la secreción de leche y el incremento de la permeabilidad entre las uniones ocluyentes del parénquima mamario, en resumen los efectos de un ordeño diario en la producción de leche son influenciados por varios factores (Rémond y Pomiès 2005).

La aplicación de un ordeño diario, estimularía la aparición de genes apoptóticos en la glándula mamaria, indicando que largos períodos de este tipo de ordeño lleva a un aumento en la muerte de las células epiteliales secretoras (Littlejohn y col., 2010). Si bien en este ensayo esto no fue medido, la disminución en la producción de leche y la posterior recuperación de la misma (en aquellas vacas que pasan a ser ordeñadas dos veces al día) sugiere que el descenso en la producción de leche debido a la aplicación de un ordeño diario, sería resultado de una disminución en la actividad secretoria de las células epiteliales y no tanto al número de las mismas como lo sugiere Davis y col. (1998).

Composición de la leche:

En este ensayo se observó un aumento en el porcentaje de grasa y una disminución de la concentración de lactosa en leche similar con lo observado en las revisiones de Davis y col. (1998) y Stelwagen y col. (2013) en las que además se observó un aumento en el porcentaje de proteína.

Al analizar los componentes en kg, estos fueron significativamente menores debido posiblemente a un efecto concentración por la menor producción de leche de las vacas ordeñadas una vez al día. Al analizar estas pérdidas se vio que la lactosa fue la que presentó la mayor disminución, siendo dicha pérdida del 41,46%, mientras que para la proteína y la grasa se registró una disminución del 37,5 y 15,9% respectivamente.

En el presente experimento (realizado en los primeros 56 días de lactación), la producción de sólidos totales (grasa más proteína) se situó un 26,78% por debajo en las vacas del T1 en comparación con aquellas ordeñadas dos veces al día. Similar al ensayo realizado por Clark y col. (2006), donde las vacas Holstein ordeñadas una vez al día durante la lactancia completa, presentaron una producción de sólidos totales del 29,4% menos que las vacas ordeñadas dos veces.

La disminución de los componentes de la leche puede ser explicada por una menor expresión de los genes y las enzimas que regulan la síntesis de grasa, proteína y lactosa en leche de las vacas ordeñadas una vez al día comparado con aquellas ordeñadas dos veces (Grala y col, 2011). Estos cambios en la composición de la leche también pueden ser atribuidos al aumento de la permeabilidad entre las uniones ocluyentes entre las células mamarias secretorias, que permite incrementar el intercambio entre la leche y el fluido

intersticial. El flujo de lactosa de la leche al plasma se acelera dramáticamente entre las 17 a 20 horas pos ordeño. El momento en el que esto ocurre, coincide con el momento en que empieza a aumentar la presión intramamaria (Davis y col., 1998). Sin embargo para este experimento, al no encontrar diferencias significativas en conductividad eléctrica de la leche entre los grupos, se puede pensar que esta disminución de la lactosa no es ocasionada por esta causa y pueden ser otros los factores que lo causen.

Al igual que lo encontrado en los ensayos realizados por Auld y Prosser (1998) y Remond y col. (2002), la producción de caseína no presentó diferencias significativas entre tratamientos, este resultado se vio reflejado en los porcentajes de proteínas de la leche que tampoco fueron afectados por los tratamientos.

En cuanto a la cantidad de urea en leche, la ausencia de diferencias entre tratamientos posiblemente sea debido a que los grupos experimentales fueron alimentados con la misma dieta y el consumo de materia seca fue similar entre los animales del grupo T1 y T2.

Salud de la glándula mamaria:

El efecto de realizar un ordeño diario se tradujo en un aumento en el RCS, al igual que en el ensayo realizado por Clark y col. (2006), donde las vacas ordeñadas una vez al día presentaron mayores RCS que las vacas ordeñadas dos veces a través de toda la lactancia; este aumento ocurre a pesar de que no haya diferencias en el número de infecciones clínicas ni subclínicas entre las vacas ordeñadas una y dos veces diarias. En el estudio llevado a cabo por Lacy-Hulbert y col. (2005) en vacas ordeñadas una vez al día durante cuatro lactancias completas, también se registró un incremento del RCS en las vacas ordeñadas una vez comparadas con las vacas ordeñadas dos veces y tampoco se vinculó con una mayor incidencia a mastitis.

Cabe resaltar que todos los animales comenzaron este experimento y por ende la lactancia, con un alto RCS (mayor a 200.000 cel/ml). Como mencionamos anteriormente las vacas ordeñadas una vez aumentaron el recuento mientras que las vacas ordeñadas dos veces disminuyeron el RCS.

La pérdida de la integridad de las uniones ocluyentes durante la lactancia establecida, inducida experimentalmente o causada por una inflamación de la glándula mamaria, ha sido relacionada con una reducción en la secreción y función mamaria, con un incremento en el intercambio entre los componentes de la leche y la sangre. Las uniones ocluyentes juegan un importante rol en la respuesta inmune de la glándula mamaria, permitiendo el ingreso de citoquinas y neutrófilos provenientes de la sangre a la luz alveolar (Stelwagen y Singh, 2013). En un estudio realizado durante la etapa inicial del período seco de las vacas, Holst y col. (1987) encontraron una disminución en la integridad de las uniones ocluyentes al inicio de la involución, acompañado de actividades autofagocíticas y heterofagocíticas involucrados en la degradación tisular, y una afluencia de leucocitos fagocíticos entre las células epiteliales alveolares. La afluencia de polimorfonucleares (PMN) inmediatamente después del

secado, como parte de la remodelación de la glándula mamaria, fue también descrita por Miller y col. (1990) y Jensen y Eberhart (1981). Cuando las vacas fueron ordeñadas cada 48 horas, la glándula comenzó un proceso de involución y esto se vio reflejado en un incremento significativo del RCS, PMN y actividad de la plasmina (citados por Kelly y col., 1997). El aumento de células somáticas puede ser debido a una leve respuesta inflamatoria, resultando en un aumento de los PMN en leche (Stelwagen y Lacy- Hubert, 1996). Dicha respuesta inflamatoria se daría en las últimas 12 hs de las primeras 24 hs de aplicación de un ordeño diario (Davis y col., 1998).

Estudios en lactancia tardía muestran que la diferencia en número de células somáticas fue menor cuando se corrigió por producción y por lo tanto el incremento tanto de RCS como de PMN sería debido aparentemente a un efecto de concentración (Kelly y col., 1997). En este experimento no se encontraron diferencias significativas de conductividad eléctrica entre los tratamientos que pudieran indicar inflamación de la glándula.

CONCLUSIONES

En las condiciones del estudio, se concluye que:

- La producción de leche fue significativamente menor en el grupo ordeñado una sola vez al día en comparación al grupo mantenido en régimen de dos ordeños diarios. Durante el período residual las vacas de un ordeño diario aumentaron la producción de forma considerable, pero sin llegar a igualar los niveles de producción de las vacas ordeñadas dos veces.
- La aplicación de un ordeño diario modificó los componentes de la leche, disminuyendo la producción de kg de grasa, proteína y lactosa.
- El recuento de células somáticas es mayor en las vacas que son sometidas a un ordeño diario; sin encontrarse diferencias significativas de conductividad eléctrica entre tratamientos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Auldism M, Prosser C (1998). Differential effects of short-term once-daily milking on milk yield, milk composition and concentrations of selected blood metabolites in cows with low or high pasture intake. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*; 58:41-43.
2. Bewsell D, Clark D, Dalley D (2008). Understanding motivations to adopt once-a-day milking amongst New Zealand dairy farmers. *The Journal of Agricultural Educational and Extension*, 14 (1): 69-80.
3. Bisinotto R, Greco L, Ribeiro E, Martinez N, Lima F, Staples C, Thatcher W, Santos J (2012). Influences of nutrition and metabolism on fertility of dairy cows. *Animal Reproduction Science*; 9 (3): 260-272.
4. Brandt M, Haeussermann A, Hartung E (2009). Invited review: Technical solutions for analysis of milk constituents and abnormal milk. *Journal of Dairy Science*; 93:427–436.
5. Chedly B, Lacasse P, Marnet PG, Boutinaud M, (2012). The decrease in milk yield during once daily milking is due to regulation of synthetic activity rather than apoptosis of mammary epithelial cells in goats. *Animal* 7(1): 124-133.
6. Clark D, Phyn C, Tong M, Collis S, Dalley D (2006). A Systems Comparison of Once- Versus Twice-Daily Milking of Pastured Dairy Cows. *Journal Dairy Science*; 89:1854–1862.
7. Davis S, Farr V, Stelwagen K (1998). Regulation of yield loss and milk composition during once-daily milking: a review. *Livestock Production Science*; 59 (1): 77-94.
8. Edmonson A J, Lean I J, Weaver L D, Farver T, Webster G A (1989). Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*; 72:68-78.
9. Grala T, Phyn C, Kay J, Rius A, Littlejohn M, Snell R, Roche J (2011) Temporary alterations to milking frequency, immediately post-calving, modified the expression of genes regulating milk synthesis and apoptosis in the bovine mammary gland. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*; 71: 3-8.
10. Grummer R (1995). Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *Journal of Dairy Science*; 73: 2820-2833.
11. Janzekovic M, Brus M, Mursec B, Vinis P, Stajniko D, Cus F (2009). Mastitis detection based on electric conductivity of milk. *Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering*; 34:39-46.

12. Kelly A, Reid S, Joyce P, Meaney W, Foley F (1998). Effect of decreased milking frequency of cows in late lactation on milk somatic cell count, polymorphonuclear leucocyte numbers, composition and proteolytic activity. *Journal of Dairy Research*; 65: 365–373.
13. Kendall P, Tucker C, Dalley D, Clark D, Webster J (2008). Milking frequency affects the circadian body temperature rhythm in dairy cows. *Livestock Production Science* ; 117 (2-3): 130-138.
14. Lacy-Hulbert S, Dalley D, Clark D (2005). The effects of once a day milking on mastitis and somatic cell count. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*; 65:137-142.
15. Littlejohn M, Walker C, Ward H, Lehnert K, Snell R, Verkerk G, Spelman R, Clark D, Davis S (2009). Effects of reduced milking frequency of milk removal on gene expression in the bovine mammary gland. *Physiological Genomics*; 41: 21-32.
16. McNamara S, Murphy J, O'Mara F, Rath M, Mee J (2007). Effect of milking frequency in early lactation on energy metabolism, milk production and reproductive performance of dairy cows. *Livestock Production Science*; 117: 70–78.
17. MGAP. DIEA (2014) Estadísticas del sector lácteo 2013. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-ipr-produccion-animal-lecheria,O.es,0>, Fecha de consulta: 1/7/2015.
18. O' Driscoll K, Gleeson D, O'Brien D, Boyle L, (2010). Effect of milking frequency and nutritional level on hoof health, locomotion score and lying behaviour of dairy cows. *Livestock Production Science*; 127: 248-256.
19. O'Brien B, Ryan G, Meaney J, McDonagh D, Kelly A (2001). Effect of frequency of milking on yield, composition and processing quality of milk. *Journal of Dairy Research*; 69: 367-374.
20. Phyn C, Kay J, Rius A, Davis S, Stelwagen K, Hillerton J, Roche J (2010). Review: Impact of short-term alterations to milking frequency in early lactation. *Australasian Dairy Science Symp.* Caxton Press, New Zealand; p.156–164.
21. Phyn C, Kay J, Rius A, Morgan S, Roach C, Grala T, Roche R (2014). Temporary alterations to postpartum milking frequency affect whole-lactation milk production and the energy status of pasture-grazed dairy cows. *Journal of Dairy Science*; 97 :6850–6868.
22. Remond B, Coulon J, Nicloux M, Levieux D (1999). Effect of temporary once-daily milking in early lactation on milk production and nutritional status of dairy cows. *Annales de Zootechnie*; 48:341-352.
23. Rémond B, Aubailly S, Chilliard Y, Dupont D, Pomiès D, Petit M (2002). combined effects of once-daily milking and feeding level in the

first three weeks of lactation on milk production and enzyme activities, and nutritional status, in holstein cows. *Animal Research*; 51: 101–117.

24. Rémond B, Pomiès D, Dupont D, Chilliard Y (2004). Once-a-day milking of multiparous Holstein cows throughout the entire lactation: milk yield and composition, and nutritional status. *Animal Research*; 53:201–212.
25. Rémond B, Pomiès D (2005). Once-daily milking of dairy cows: a review of recent French experiments. *Animal Research*; 54: 427–442.
26. Schröder U y Staufenbiel R (2006). Invited Review: Methods to Determine Body Fat Reserves in the Dairy Cow with Special Regard to Ultrasonographic Measurement of Backfat Thickness. *Journal of Animal Science*; 89:01-14.
27. Stelwagen K, Davis S.R, Farr V.C, Prosser C.G, Sherlock R.A (1993). Mammary epithelial cell tight junction integrity and mammary blood flow during an extended milking interval in goats. *Journal of Dairy Science*; 77: 426-432.
28. Stelwagen K, Poutis I, White J, Zavzlon B (1994). Effect of milking frequency and somatotropin on the activity of plasminogen activator, plasminogen, and plasmin in bovine milk. *Journal of Dairy Science*; 77: 3577–3583.
29. Stelwagen K y S.J. Lacy-Hulbert (1996). Effect of milking frequency on somatic cell count characteristics and mammary secretory cell damage in cows. *American Journal of Veterinary Research*; 57: 902-905.
30. Stelwagen K (2001). Effect of milking frequency on mammary functioning and shape of the lactation curve. *Journal of Dairy Science*; 88: 204-211.
31. Stelwagen K, Phyn V, Davis S, Guinard-Flament J, Pomiès D, Roche J, Kay J (2013) Invited review: Reduced milking frequency: Milk production and management implications. *Journal of Dairy Science*; 96(6): 3401-3413.
32. Stelwagen K y Singh K (2013). The Role of Tight Junctions in Mammary Gland Function. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*; 19:131–138.