



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**TÍTULO:**

**INCLUSIÓN DE PASTURA TEMPLADA EN UNA DIETA  
COMPLETA TOTALMENTE MEZCLADA EN VAQUILLONAS**

**Efectos Sobre el Consumo, el Aprovechamiento Digestivo y  
Metabólico de los Nutrientes.**

Alvaro Santana Fernandez

**TESIS DE MAESTRÍA EN NUTRICIÓN DE RUMIANTES**

**URUGUAY  
2012**

**ESTA HOJA VA EN BLANCO**



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**TÍTULO:**

**INCLUSIÓN DE PASTURA TEMPLADA EN UNA DIETA  
COMPLETA TOTALMENTE MEZCLADA EN VAQUILLONAS**

**Efectos Sobre el Consumo, el Aprovechamiento Digestivo y  
Metabólico de los Nutrientes.**

Alvaro Santana Fernandez

---

**Jose Luis Repetto**  
Director de Tesis

---

**Pablo Zunino**  
Co-director

---

**Cecilia Cajarville**  
Co-director

**2012**

## **INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE**

### **DEFENSA DE TESIS**

**Nombre; títulos**  
**Instituto, Departamento o Facultad**  
**Institución - País**

**(ejemplo)**

**Maria Jesus Marichal; DVM, MS**  
**Facultad de Agronomía**  
**Universidad de la Republica – Uruguay**

**Darío Colombato; MS, PhD**  
**Departamento de Agro Negocios**  
**Universidad de Buenos Aires – Argentina**

**Diego Antonio Mattiauda; MS**  
**Facultad de Veterinaria**  
**Universidad de la República - Uruguay**

**EN ESTA HOJA VA LA COPIA DEL  
ACTA DE DEFENSA DE TESIS**

**En esta hoja va el Informe del Tribunal**

## **AGRADECIMIENTOS y DEDICATORIA**

*Sinceramente deseo agradecer:*

A mi familia por su incondicional apoyo en cada día de mi vida.

A mi tutor, José Luis Repetto, y a mis cotutores, Cecilia Cajaraville y Pablo Zunino, por su constante guía, orientación y respaldo en mi desarrollo profesional.

A todos los integrantes del tribunal de tesis, a Alejandro Mendoza, por sus aportes que mejoraron esta tesis.

A la Facultad de Veterinaria por permitirme formar parte del Programa de Posgrados.

A mis compañeros de los departamentos de Nutrición Animal, Producción de Bovinos y Tecnología Agropecuaria por enriquecer este trabajo con múltiples aportes en todas sus etapas, Alejandro Britos, Carolina Fiol, Martin Agerre, Analia Perez, Sebastián Branvillasca, Santiago Monteverde, Alicia Felix, German Antunez y Natalia Hernandez

Al personal del Campo experimental N°2 por su colaboración en el trabajo de campo: Elena, Maxi, Federico, Adriana y Damián

A todos los tesisistas sin quienes este trabajo solo sería una idea, Jacinta, Diego, Fernando, Matias, Mariana, Lorena, Ana Claudia, Juan Pablo y Silvana.

***Dedico este trabajo*** a mis tres relegadas en el tiempo, pero motor fundamental de mi accionar, Virginia, Sofia y Agustina

*“Felicidad no es hacer lo que uno quiere sino querer lo que uno hace”*

Jean Paul Sartre

## LISTA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	I
LISTA DE CONTENIDOS	II
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	III
LISTA DE ABREVIATURAS	IV
RESUMEN	1
SUMARY	2
INTRODUCCION	3
ANTECEDENTES ESPECIFICOS	4
<i>Efecto de diferentes regímenes de alimentación (RTM, pastura o ambos) sobre el consumo y digestibilidad del alimento, el ambiente ruminal, el metabolismo de la glucosa y el N en rumiantes.</i>	
a) Regímenes de alimentación	4
b) El consumo y aprovechamiento digestivo de los nutrientes	5
c) El pH ruminal, glicemia e insulinemia	6
d) El metabolismo del nitrógeno	8
e) Síntesis	10
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
HIPÓTESIS	11
OBJETIVOS	11
MATERIALES Y METODOS	12
RESULTADOS	19
DISCUSIÓN	24
CONCLUSIONES	30
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31



## LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

<b>CUADRO I.</b> Composición química (media $\pm$ DE) de la pastura, la RTM y los alimentos utilizados para formular la RTM.	14
<b>CUADRO II.</b> Participación porcentual en MS de cada componente de la RTM.	15
<b>CUADRO III.</b> Consumo diario de MS, MO y los componentes no nitrogenados de la dieta, en vaquillonas alimentadas con RTM, pastura o ambos.	19
<b>CUADRO IV.</b> Coeficiente de digestibilidad aparente (CD) de la MS y los componentes no nitrogenados de la dieta, en vaquillonas alimentadas con RTM, pastura o ambos.	20
<b>CUADRO V.</b> Valores medios de pH y concentraciones de N-NH <sub>3</sub> en vaquillonas alimentadas con RTM, pastura o ambos.	21
<b>CUADRO VI.</b> Concentración media de metabolitos (glucosa y urea) y hormonas (insulina y glucaón) sanguíneas en vaquillonas alimentadas con RTM, pastura o ambos.	22
<b>CUADRO VII.</b> Consumo y digestibilidad de las fracciones nitrogenadas, retención de nitrógeno y síntesis de proteína microbiana en vaquillonas alimentadas con RTM, pastura o ambos.	23
<b>CUADRO VIII.</b> Composición química media y error estándar (SE) de la pastura en los diferentes periodos.	24
<b>FIGURA 1.</b> Diagrama general del flujo del N en los rumiantes.	8
<b>FIGURA 2.</b> Esquema del protocolo experimental.	13
<b>FIGURA 3.</b> Dinámicas diarias de pH y N-NH <sub>3</sub> ruminal en vaquillonas alimentadas con RTM, pastura o ambos.	21
<b>FIGURA 4.</b> Concentraciones de glucosa a las 0h (10 AM), 2h, 4h y 8h en vaquillonas alimentadas con RTM, pastura o ambos.	22

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

AGVs: ácidos grasos volátiles  
C.H.E.A: Comisión Honoraria de Experimentación Animal  
CHO: carbohidratos  
CD: coeficiente de digestibilidad aparente  
CNF: carbohidratos no fibrosos  
ESPM: eficiencia de síntesis de proteína microbiana  
EUN: eficiencia de uso del nitrógeno en rumen  
FAD: fibra ácido detergente  
FND: fibra neutro detérgete  
MO: materia orgánica  
MODI: materia orgánica digestible ingerida  
MOF: materia orgánica fermentable en rumen  
MS: materia seca  
N: nitrógeno  
N-NH<sub>3</sub>: nitrógeno amoniacal  
PA: tratamiento Pastura 24h  
PB: proteína bruta  
PV: peso vivo  
RIA: radioinmunoanálisis  
RN: retención de nitrógeno  
RTM: ración totalmente mezclada  
RTM+PA: tratamiento RTM 18h + pastura 6h  
SPM: síntesis de proteína microbiana  
TS: tasa de sustitución  
UdelaR: Universidad de la República

## RESUMEN

El objetivo fue evaluar cómo se afectan el consumo y el aprovechamiento digestivo de los nutrientes, el ambiente ruminal, y el metabolismo glucosídico y nitrogenado en vaquillonas alimentadas con una ración balanceada y totalmente mezclada (RTM), forraje fresco o ambos. En un diseño de 3 cuadrados latinos de 3x3, se utilizaron 9 vaquillonas cruza ( $214 \pm 18$  kg PV) fistuladas en rumen, alojadas en jaulas individuales. Según el tratamiento las vaquillonas fueron alimentadas, sin restricción de cantidad con pastura compuesta principalmente por *Trifolium repens*, *Trifolium pratense* y *Lolium multiflorum* (PB=13,0%; FDN=46,6%) durante 24 h (**Pastura**), o con RTM compuesta por un 64 % grano de maíz, 25% silo planta entera de sorgo, 8,1 % harina de soja y 2,9 % de núcleo (PB=9,2%; FDN=25,0%), durante 24 h (**RTM**), o 18 h RTM + 6 h de pastura (**RTM+PA**). Cada período experimental consistió en 10 días de adaptación y 8 de mediciones. Se determinó el consumo de alimentos y la digestibilidad de distintas fracciones químicas (MS, MO, FDN, FDA, PB). Se calculó la retención de N (RN) y la síntesis de proteína microbiana a través de los derivados púricos en orina. En cada período se tomaron muestras de contenido ruminal para determinar la cinética de pH y N-NH<sub>3</sub>, y se extrajo sangre para determinar las concentraciones y dinámicas de glucosa, urea e insulina. Los datos fueron analizados utilizando el Proc Mixed (SAS), considerando los efectos período (anidado en el cuadrado), tratamiento y para las variables con medidas repetidas se considero además el efecto de la hora. El consumo de MS del tratamiento Pastura fue menor respecto a los otros dos tratamientos. Existió una tendencia del tratamiento RTM+PA a consumir una mayor cantidad de MS como % del PV que el tratamiento RTM. No se detectaron diferencias en la digestibilidad aparente de la MS ni MO entre tratamientos, pero existió una mayor digestibilidad de la FDN, FDA y PB en el tratamiento Pastura respecto a los restantes. El tratamiento Pastura presentó valores de pH ruminales mayores que los otros tratamientos, que no difirieron entre sí. El mayor consumo de CNF del tratamiento RTM se relacionó con mayores glicemias y un metabolismo energético más activo que el tratamiento Pastura. Se detectó una tendencia del tratamiento RTM a presentar mayor insulinemia respecto al tratamiento RTM+PA. La RN fue mayor para Pastura respecto a RTM, quedando RTM+PA en una situación intermedia sin diferir de ambos. La síntesis de proteína microbiana fue menor para el tratamiento Pastura respecto a los otros dos tratamientos, mientras que la eficiencia de uso de la energía y el N para síntesis de proteína microbiana fue mayor en el tratamiento RTM respecto a al tratamiento Pastura, y no se afectó en relación al tratamiento RTM+PA. La inclusión de 6 h de pastura en la dieta de vaquillonas consumiendo RTM tendió a aumentar el consumo de nutrientes y mejorar la digestibilidad del N, sin afectar el metabolismo glucosídico o del N, manteniendo los niveles y eficiencia de síntesis de proteína microbiana respecto a dietas RTM.

## SUMMARY

The objective was to evaluate how the consumption and digestive utilization of nutrients, ruminal environment, energy and nitrogen metabolism were affected when heifers were fed three diets: a balanced and completely mixed ration (RTM), fresh forage or both. Nine cross breed heifers ( $214 \pm 18$  kg BW) fitted with ruminal fistulas and housed in individual stalls in a 3x3 Latin square design were used. Treatments consisted in: free access to a pasture (CP=13.0%, NDF=46.6%) composed of *Trifolium repens*, *Trifolium pratense* and *Lolium multiflorum* (63, 18 and 15%, respectively) for 24 h (Pasture); free access to a TMR diet (CP=9.2%; NDF=25%) composed of corn grain, whole plant sorghum silage and soybean meal for 24 h (TM); or 18 h TMR + 6 h pasture (RTM+PA). Each experimental period consisted of 10 d adaptation period and 8 d for measurements. Daily intake and digestibility of different chemical fractions (DM, OM, NDF, ADF) were determined. N retention (NR) was calculated and microbial protein synthesis was assessed measuring urine purine derivatives. Ruminal content was sampled during each period in order to evaluate pH and N-NH<sub>3</sub> concentration kinetics, and blood samples were extracted to determine glucose, urea and insulin dynamics. Data were analyzed using the Proc Mixed (SAS), considering the effects of period (nested in the square), treatment, time and their interaction. DM intake of Pasture treatment was lower compared to the other two treatments. There was a trend ( $p=0.068$ ) of RTM+PA treatment to consume higher quantities of DM expressed as % of BW than RTM. No differences were detected in the apparent digestibilities of DM and OM between treatments, but Pasture presented higher NDF, ADN and CP digestibilities. Ruminal pH values were higher for Pasture than the other treatments, with no differences between RTM and RTM+PA. The higher NFC intake in RTM was related with higher glycaemia and a more active energetic metabolism than Pasture treatment. Insulinemia trend to be higher (valor de P) in RTM than in RTM+PA. The NR was higher for Pasture than RTM, while RTM+PA did not differ from the others. Microbial protein synthesis was lower for Pasture than the other two treatments, while the energy and N efficiency for microbial synthesis was higher for RTM than for Pasture. The 6h access to pasture in heifers fed RTM diets tended to enhance the intake of nutrients and N digestibility, with no responses on glucose and N metabolism, and similar efficiencies of microbial protein synthesis respect to RTM diets.

## INTRODUCCIÓN

En la región sur de Sudamérica (países del MERCOSUR) se asienta el 24% del stock bovino mundial, unos 240 millones de bovinos. Es además la primera región exportadora de productos derivados de los mismos (cárnicos y lácteos), encontrándose aun lejos de su potencial productivo (Caputi y Méndez, 2010).

En la región, y particularmente en Uruguay, ha existido un crecimiento productivo que se sustenta en el incremento de la producción individual y por unidad de superficie, ya que la posibilidad de expansión física de los sistemas de producción animal se ha visto limitada por el crecimiento de otros rubros como la forestación y la agricultura (DIEA 2010). Esto, sumado a la mayor disponibilidad de sub productos agroindustriales que son utilizados para la alimentación animal, determina que el manejo de la alimentación sea cada vez más importante.

La intensificación de los sistemas productivos complejiza los sistemas de alimentación y los fuerza a maximizar sus resultados productivos y márgenes económicos. Concomitantemente, esta región presenta, por sus (características geológicas y climáticas), ventajas comparativas para la producción de pasturas a bajo costo relativo. Los productos derivados de animales alimentados con pastura poseen características nutracéuticas que les confieren un nicho de mercado específico, existiendo un renovado interés a nivel mundial respecto a la inclusión de pasturas frescas en la dieta de bovinos, en la medida en que esta práctica podría traer beneficios tanto para el productor como para el consumidor final. Es dificultoso incorporar pasturas frescas a la Ración Totalmente Mezclada (**RTM**) por un problema de volumen y de capacidad de mezclado, lo que hace necesario estudiar la forma más conveniente de combinar ambos sistemas de alimentación.

Existe información acerca del aporte de nutrientes, digestibilidad y metabolismo de animales alimentados únicamente con pasturas templadas o con raciones totalmente mezclada (RTM). Sin embargo, son más escasos los antecedentes acerca de la comparación entre ambos sistemas (RTM vs Pastura) y se centran principalmente en el desempeño productivo y económico de animales alimentados con uno u otro sistema. La información disponible acerca de la combinación de ambos sistemas de alimentación en una escala temporal diaria es aún más limitada, no habiéndose encontrado reportes acerca de las consecuencias nutricionales y metabólicas de combinar ambos sistemas de alimentación en vaquillonas de razas carniceras en desarrollo.

El estudio de los aspectos nutricionales y metabólicos de alimentar animales con raciones totalmente mezcladas en combinación con pasturas templadas es determinante para el desarrollo de estrategias que permitan optimizar la productividad y rentabilidad en estos sistemas mixtos de alimentación, que tiendan a capitalizar las ventajas de los sistemas RTM, reteniendo los beneficios de la inclusión de pasturas en la alimentación de rumiantes.

## ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

*Efecto de diferentes regímenes de alimentación (RTM, pastura o ambos) sobre el consumo y digestibilidad del alimento, el pH ruminal, la glicemia e insulinemia y el metabolismo del N en rumiantes.*

### a) Regímenes de alimentación

Las RTM son un sistema de alimentación donde los forrajes y alimentos concentrados son completamente mezclados, y de esta forma son ofrecidos a los animales. El uso de RTM para la alimentación de bovinos fue recomendado en países del Hemisferio Norte (principalmente EEUU y Europa) a partir de la década del 60, ya que la mezcla de distintos ingredientes en una única ración tiene como ventaja la posibilidad de ofrecer una dieta con un aporte balanceado y sincronizado de nutrientes y una óptima relación forraje – concentrado, y con mínima posibilidad de selección por componentes individuales de la ración (Gill, 1979; Coppock et al., 1981). Esto determina que la formulación de la dieta sea más precisa cuando se ofrece una RTM que cuando se ofrecen sus ingredientes por separado.

Por otro lado las pasturas templadas son una fuente de nutrientes de bajo costo relativo para ser usadas en la alimentación de rumiantes. La materia orgánica (**MO**) y las fracciones nitrogenadas de este tipo de pasturas son altamente degradadas en rumen (Hoffman et al. 1993; Elizalde et al. 1999; Bargo et al. 2003; Repetto et al. 2005). Sin embargo, su concentración energética, además de sus altos contenidos de humedad y fibra, pueden resultar en bajos consumos de materia seca (**MS**) y energía por parte de los animales (NRC, 2001). Recientemente ha existido un renovado interés a nivel mundial respecto a la inclusión de pasturas frescas en la dieta de vacas lecheras, en la medida en que esta práctica podría traer beneficios tanto para el productor como para el consumidor final. En nuestras condiciones, el pastoreo de pasturas templadas, cuando es bien manejado, supone una alternativa económicamente rentable para la alimentación de rumiantes de alta producción (Dillon, 2006). Comparados con los sistemas de alimentación RTM, los sistemas de base pastoril ofrecen una imagen más “amigable” con el ambiente, en la medida en que minimizan la polución y tienen menos efectos negativos sobre la calidad del suelo (Hanson et al., 1998; Soder y Rotz, 2001). Asimismo, los sistemas pastoriles pueden tener beneficios sobre la salud de los animales respecto a sistemas de confinamiento, y desde este punto de vista se considera que promueven un mayor bienestar de los mismos (Rushen et al., 2008).

La combinación de ambos sistemas (RTM y pastura) a lo largo del ciclo productivo ha sido estudiado en cuanto a sus efectos sobre la performance animal y características del producto en bovinos de carne (Neel et al., 2007. ). En Uruguay particularmente, se han desarrollado esquemas productivos combinando ciclos de alimentación en base pastura o RTM, en la recría de vaquillonas lecheras en confinamiento (CONAPROLE, 2008) o en el ciclo productivo de novillos para carne el esquema Invierno Carga Cero (ICACE) desarrollado por la Unidad de Producción Intensiva de Carne (UPIC) en la estación experimental Mario Cassinoni en Paysandú. Sin embargo, la combinación de ambos sistemas productivos en una escala temporal diaria ha sido menos estudiada. En Uruguay existen antecedentes con vacas lecheras primíparas en producción evaluando la producción y la composición de la leche, la evolución del estado corporal, la eficiencia reproductiva y los perfiles metabólicos con diferentes niveles de asignación de forrajes con 7h de

pastoreo (Adrien, 2010). En este trabajo se comunicó una menor producción de leche con los animales que consumieron pastura, sin diferencias en la duración del anestro. Nuestro equipo ha incursionado en esta área con los trabajos de Mendoza et al. (2012 a y b), quienes con vacas lecheras de alta producción observaron similares consumos y producciones de leche en dietas que solo consistían de RTM, o RTM y 4 horas de acceso a un forraje fresco (*Lolium multiflorum*). Trabajando con vacas lecheras en producción Loor et al, (2003), comparó el consumo de MS y la producción de vacas alimentadas sólo con RTM 61% MS, en base seca: (17,6% FDA, 18% PB) o con RTM y 8h de pastura (18% MS, 27% FDA, 27% PB), y reportó una disminución en el consumo de MS pero igualdad de producción cuando adicionó pastura en la dieta, lo que implicaría un mejor aprovechamiento digestivo de los nutrientes, ya que no encontró diferencias en las variaciones de peso vivo (PV) y estado corporal.

#### b) El consumo y aprovechamiento digestivo de los nutrientes

El consumo voluntario de nutrientes, en general expresado como kg de MS o MO consumida por animal y por día, es una variable determinante de los resultados productivos y económicos de cualquier sistema de producción bovino. Los alimentos representan entre el 50 y 80% de los costos de producción, cobrando mayor relevancia cuanto más intensiva es la explotación. Existe además una estrecha relación entre la performance productiva de un animal y su consumo de materia orgánica digerible ingerida (**MODI**) (Tucker et al., 2001).

Se han desarrollado diversas aproximaciones matemáticas que cuantifican y ponderan la interacción entre estímulos e inhibiciones del consumo voluntario. En este sentido, Poppi et al. (1994) desarrollaron un modelo con seis variables básicas con factores físicos de llenado (distensión) y de tránsito (MS defecada), degradación de sustratos y concentración de metabolitos. Algunos enfoques consideran otros aspectos metabólicos como la eficiencia de obtención de energía mediante la oxidación de los sustratos, o sea, la cantidad de energía neta ingerida (ENI) sobre el consumo de oxígeno (ENI/Consumo de O<sub>2</sub>) (Keteelars y Tolkamps, 1996). Otro enfoque para cuantificar y ponderar múltiples variables para establecer el consumo voluntario es la idea de mínimo discomfort total (Forbes, 2005). En bovinos pastoreando pasturas templadas se han identificado restricciones del consumo de MS de tipo físicas (i.e. digestión y pasaje de material por el tracto digestivo), por limitación de tiempo (i.e. para actividades de búsqueda, cosecha y rumia del forraje ingerido), o por la alta cantidad de agua ingerida junto a la pastura (Chilibroste et al., 2005; Dillon, 2006) entre otros factores.

Existe cierto consenso que si se comparan animales alimentados exclusivamente en base a pastura o RTM, el consumo de nutrientes (particularmente energía) que los bovinos bajo condiciones de pastoreo pueden alcanzar es menor respecto a cuando son alimentadas con RTM, y en consecuencia, el potencial de producción no se explota completamente (Kolver y Muller., 1998; Tucker et al., 2001; Schroeder et al., 2005). Cuando se incluye pastura en la dieta de animales que se encuentran consumiendo RTM como alimento de base los resultados no son tan concluyentes, encontrándose reportes de disminución del consumo de MS con la inclusión de pasturas (Soriano et al., 2001; Trozer et al., 2003; Loor et al., 2003) pero también se han reportado igualdad de consumo (Vibart et al., 2008 (a), Morales et al., 2010).

La digestibilidad aparente de la dieta está determinada por la tasa y extensión de la degradación de cada sustrato (digestibilidad específica de cada alimento), sus proporciones en la misma y las interacciones entre ellos. Las pasturas templadas presentan alta digestibilidad de la MS (>60%) (Cajarville et al., 2006; Tebot et al., 2011), al igual que los granos de maíz y la harina de soja que presentan digestibilidades altas (> 70%), mientras que el ensilado de sorgo de planta entera presenta un rango variable de digestibilidad más amplio y en general de medio a bajo (<60%). Las interacciones posibles son variadas y diversas. Evaluando el efecto de la inclusión de una pastura templada (17% MS, 23% PB, 26% FDA) en dietas RTM para vacas lecheras, Bargo et al., (2002a) no encontraron diferencias en la digestibilidad aparente de la MS total entre dietas sólo RTM o RTM con acceso a pastura durante 9h (62,3 y 64,1 %, respectivamente).

c) El pH ruminal, glicemia e insulinemia

El metabolismo energético en los rumiantes posee dos sustratos principales, los carbohidratos (**CHO**) y/o los lípidos. En dietas comunes para rumiantes el EE suele ser menos del 6% de la MS, por lo que son los CHO los principales sustratos energéticos en los rumiantes. Estos CH pueden ser estructurales, fibra detergente neutro (**FDN**) y fibra detergente ácido (**FDA**) o carbohidratos no fibrosos (**CNF**) (almidón, azúcares y peptinas). La pectina que desde un punto de vista fisiológico está unida a la pared vegetal, posee una unión labil y es fermentada en el rumen en un alto porcentaje. La mayor parte de los CHO, son fermentados en el rumen generando ácidos grasos volátiles (**AGVs**) principalmente acetato [C2], propionato [C3] y butirato [C4], nitrógeno amoniacal (**N-NH<sub>3</sub>**), gases (2/3 CO<sub>2</sub> y 1/3 CH<sub>4</sub> y células microbianas (Church, 1993). Los AGVs pueden considerarse desechos del metabolismo de los microbios ruminales, pero desde el punto de vista del rumiante constituyen la principal fuente energética. Normalmente los AGVs contribuyen con el 50 – 70% de la energía digestible contenida en el alimento. La fermentación de la fibra da lugar a una fermentación más acética, mientras que dietas ricas en almidón generan una fermentación más propiónica, pudiendo incluso escapar almidón a la degradación en el rumen y ser digerido y absorbido como glucosa en el intestino (Relling y Mattioli, 2003). Esta glucosa absorbida en el intestino cubre el 5 al 15 % de los requerimientos energéticos cuando la dieta es rica en fibra, y llega al 30 % si ésta es rica en almidón con capacidad pasante. Los AGVs son absorbidos fundamentalmente a nivel ruminal, aunque un 10 – 20% puede escapar de rumen y ser absorbido en abomaso; en rumen se absorben de forma pasiva a favor de un gradiente de concentración y pH entre el lumen ruminal y la sangre (Kozloski, 2002).

El pH del medio ruminal es el resultado del equilibrio entre la formación de ácidos y los elementos tamponantes (absorción, pasaje y buffers). En un experimento realizado por Bargo et al. (2002a) no se encontraron diferencias en el pH ruminal de vacas lecheras consumiendo dietas solo RTM o RTM con acceso a pastura, si bien es destacable que los valores promedio de pH ruminal (5,9) observados en vacas consumiendo pasturas templadas de buena calidad se encuentran por debajo del límite óptimo para la degradación de la fibra por los microorganismos (pH = 6,2) (Van Soest et al., 1994). Esto ha sido reportado por otros autores en vacas alimentadas con pasturas templadas y suplementadas con concentrados (Chilibroste et al., 2005; Cajarville et al., 2006). El hecho que estas pasturas tengan una alta concentración de MO fermentable en rumen y un bajo contenido de fibra capaz de promover la rumia y la salivación, resulta en una gran producción de ácidos en



rumen (Kolver y de Veth, 2002), lo que puede estar contribuyendo a estos bajos pH. Adicionalmente, la práctica de ofrecer el concentrado durante los ordeños, en oposición a ofrecerlo en otros momentos del día (como ocurre al utilizar una RTM), también podría acentuar las condiciones de acidez generadas en condiciones de pastoreo (Huffman, 1961); esto explicaría por qué el contenido de grasa láctea puede ser menor en vacas alimentadas con pastura + concentrado energético respecto a RTM o pastura + RTM, aún cuando tengan un alto consumo de fibra (Bargo et al., 2002b). En sentido opuesto, la oferta de una fuente de fibra al mismo tiempo que los alimentos concentrados, como ocurre en una RTM, minimizaría las variaciones en la tasa de producción de ácidos y por tanto del pH ruminal (Coppock et al., 1981).

Los nutrientes absorbidos a nivel del tracto gastrointestinal llegan vía portal al hígado, órgano clave a nivel metabólico siendo responsable del 80 - 90 % de la neoglucogénesis en los rumiantes. La glucosa es el principal sustrato energético para el cerebro, la glándula mamaria, el feto y el músculo. El hígado emplea como principales sustratos neo glucogénicos al propionato, lactato, aminoácidos y glicerol. El aporte relativo de cada uno depende del balance energético del animal. El propionato producido a nivel ruminal es cuantitativamente el principal precursor neoglucogénico en los rumiantes (Drackley et al., 2001; Hungtington et al., 2006), aportando entre el 55 y 70% de la glucosa formada en hígado (Reynolds et al. 1988; Reynolds et al., 2003; Hungtington et al., 2006). La tasa de conversión de propionato a glucosa en animales consumiendo dietas ricas en concentrados es mayor que en aquellos consumiendo dietas altas en forraje (Drackley et al., 2001). El glucógeno hepático en los rumiantes es casi exclusivamente sintetizado de neoglucogénesis, ya que la falta de carboxiquinasa, limita la fosforilación oxidativa (a glucosa-6-fosfato) y esto el ingreso de glucosa al hepatocito.

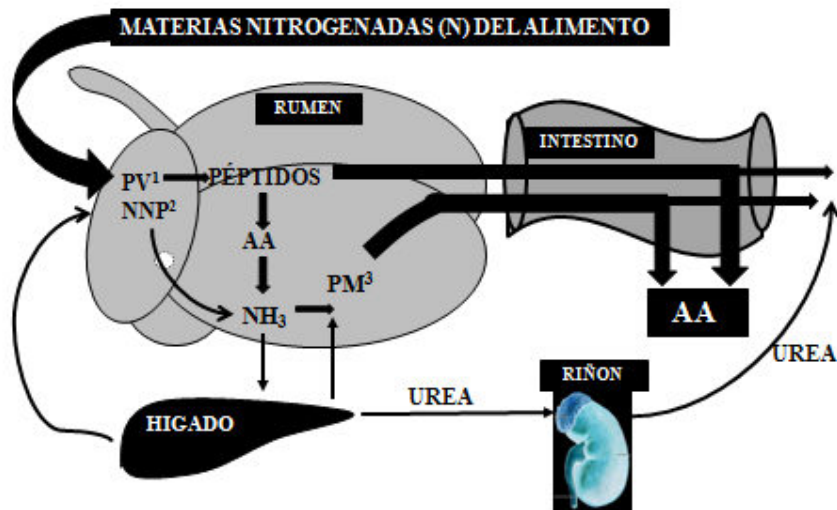
Las 2 principales hormonas que regulan los niveles de glucosa en sangre son la insulina y el glucagón (Coffee, 1998; Drackley et al., 2001). La insulina, hormona polipeptídica secretada por las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans juega un rol clave en la regulación del crecimiento y utilización de nutrientes en los rumiantes. Por ejemplo, promueve la captación de glucosa por los tejidos, la síntesis de glucógeno, la glucólisis y la síntesis de ácidos grasos en hígado (Coffee, 1998). Si bien la insulina disminuye la neoglucogénesis hepática al disminuir la síntesis de glucosa desde sustratos que entran vía piruvato, no altera la conversión de propionato a glucosa (Drackley et al., 2001; Hungtington et al. 2006). De manera inversa a la acción de la insulina, el glucagón promueve la liberación de glucosa a la sangre, estimula directamente la conversión de propionato en glucosa y el uso de aminoácidos para la neoglucogénesis (Drackley et al. 2001). La regulación de la homeostasis de la glucosa resulta (entre otros aspectos) de la interacción de estas 2 hormonas. Altos niveles de insulina contrarrestan los efectos del glucagón, por lo que la variación en la relación insulina/glucagón juega un papel muy importante en la regulación de la neoglucogénesis (She et al., 1999; Drackley et al., 2001).

Comparando distintos sistemas de alimentación Bargo et al., (2002a) reportaron una menor concentración de ácidos grasos no esterificados en plasma en animales alimentados con RTM + pastura respecto a concentrado + pastura, lo que sugiere un mejor balance de energía y una menor movilización de reservas corporales al incluir RTM en dietas con pasturas. En cuanto a la efecto de la inclusión de pastura en la dieta de animales consumiendo RTM, Vibart et al., (2008) reportaron una disminución lineal de la glicemia (61,5 mg/dl a 57,7 mg/dl) con el incremento en la proporción de pastura en la dieta de vacas lecheras en producción, así como una

mayor lipomovilización, sugiriendo un deterioro del metabolismo energético con la inclusión de pastura. Por otro lado Soriano et al. (2001), Adrién et al. (2006) y Morales et al. (2010) informan la ausencia de efecto en la variación de peso vivo o glicemia, con la inclusión de pastura en la dieta de vacas lecheras consumiendo RTM.

d) El metabolismo del nitrógeno

Todas las proteínas celulares del organismo se encuentran en continuo recambio (“turnover”) en el cual son sintetizadas (anabolismo) y degradadas (catabolismo) sustancias proteicas. El metabolismo del nitrógeno (N) es un aspecto clave en la fisiología digestiva de los rumiantes. Inicialmente las investigaciones se han centrado en los mecanismos mediante los cuales los rumiantes ejercen su ventaja evolutiva de utilizar diversas fuentes de N inorgánico para producir proteína verdadera, gracias a la simbiosis establecida con la biota ruminal (Eastridge, 2006; Bach et al., 2005). En la **Figura 1** se representan las principales vías del flujo de N en un rumiante adulto. En estos animales el N ingerido será en parte degradado a nivel ruminal, otra fracción continuará intacta y será digerida en el intestino delgado, mientras que una última fracción no se degradará y será excretada. Adicionalmente, las fracciones degradadas en el rumen serán utilizadas por los microorganismos ruminales para la síntesis de su propio soma, multiplicando así la población de microorganismos que serán digeridos y absorbidos en el tracto gastrointestinal posterior (Church, 1993).



**Figura 1.** Diagrama general del flujo del N en los rumiantes. <sup>1</sup> Proteína Verdadera (PV), <sup>2</sup> Nitrógeno No Proteico (NNP), <sup>3</sup>Proteína Microbiana (PM). Elaboración propia.

Posteriormente las diferentes fuentes (alimentos), cantidades y fracciones (químicas) de N aportadas en la dieta y su efecto en el metabolismo de los animales ha sido objeto de estudio (Castillo et al., 2001; Reynald y Broderick, 2005). La mayor comprensión del proceso mediante el cual se realiza la reducción ruminal de los compuestos nitrogenados para liberar N-NH<sub>3</sub> (Brock et al., 1982; Prins et al., 1983), así como el mayor conocimiento de los diferentes alimentos proteico (Sniffen et al., 1992), han contribuido a establecer que la extensión y velocidad de degradación para una fuente proteica dependerá de la actividad proteolítica de la micro flora

ruminal, el tipo de proteína (susceptibilidad y accesibilidad a los enlaces peptídicos) y la tasa de pasaje del alimento. Evaluando el efecto sobre la concentración de N-NH<sub>3</sub> ruminal, no se detectaron diferencias en vacas lecheras consumiendo sólo RTM (17% PB) o 30 % de la MS de la dieta aportada por pastura (26% PB) y el resto RTM (Bargo et al., 2002). Tampoco *in vitro* Vibart et al., (2010), sustituyendo RTM por pastura en fermentadores continuos desde 100% MS de RTM, hasta 55% de la MS de RTM y 45 % de la MS de pastura, observaron diferencias en la concentración de N-NH<sub>3</sub> en el medio de incubación.

Por otro lado ha sido documentado que las pasturas templadas poseen en general altos porcentajes de proteína bruta (**PB**), siendo ésta de alta degradabilidad ruminal (Chilibroste et al., 2005; Cajarville et al., 2006). Esto produce importantes niveles de N-NH<sub>3</sub> y excreción de urea al medio ambiente. Por esto, se han conducido diversos estudios acerca de cómo mejorar la utilización del N en animales alimentados con pasturas para disminuir la contribución de los rumiantes a la polución medioambiental (Hoekstra et al., 2007). Trabajando con diferentes sistemas de alimentación, Bargo et al. (2002b) encontraron que en comparación con las vacas alimentadas con RTM, las alimentadas con pastura + RTM tuvieron igual concentración de urea en plasma y mayor concentración de urea en leche, lo que sugiere un mayor aprovechamiento del nitrógeno ingerido por los animales consumiendo sólo RTM.

Se han desarrollado básicamente dos enfoques teóricos sobre la disponibilidad de nutrientes y el desempeño animal. Un enfoque de “Sincronía” de nutrientes, donde se esboza la necesidad de disponer simultáneamente de fuentes de carbohidratos y N para mejorar la síntesis de proteína microbiana (**SPM**), que debido a sus cualidades (alto valor biológico y digestibilidad) podría impactar positivamente sobre la producción animal (Lapierre y Lobley, 2001; Cabrita et al., 2006). Por otro lado, un enfoque “Asincrónico” esboza que debido a la diversidad de poblaciones ruminales, lo que sería sincrónico para algunos microorganismos, no lo sería para otros en un momento dado. Además los diversos estados metabólico - fisiológicos de los animales contribuirían a generar diferentes estados de homeostasis y homeoresis, que determinan flujos de nutrientes disímiles, con diferentes tasas de recirculación y utilización de los nutrientes (Hall y Huntington 2007; Reynolds y Kristensen, 2008).

Adicionalmente, la eficiencia de transferencia de nitrógeno a producto, que es baja en vacas alimentadas con RTM, es aún menor cuando son alimentadas con pasturas templadas, probablemente debido a la alta concentración de proteína soluble en las mismas, y a una posible falta de sincronización entre el aporte de nitrógeno y carbohidratos para los microorganismos del rumen (Hoekstra et al., 2007). Sin embargo la alimentación de los rumiantes con estas pasturas en estados fenológicos adecuados (adecuado balance CH/PB) parecen proveer una fuente de sustratos óptima para maximizar la eficiencia de síntesis de proteína microbiana (**ESPM**) (30 - 40 g SPM/kgMODI), que no ha podido mejorarse mediante la suplementación con diferentes fuentes energéticas (Sannes et al., 2002; Tebot et al., 2011). Por su parte Vibart et al., (2010), trabajando *in vitro* con fermentadores continuos con mezclas de RTM (50% MS, 22% FDA y 16% PB) y pastura (*Lolium multiflorum*: 25% MS, 21% FDA y 30% PB), reportaron un aumento lineal de la síntesis de proteína microbiana y del % de fermentescibilidad real de la MS con la inclusión de pastura hasta niveles del 45% de la MS. Contrariamente, Bargo et al. (2002b) reportaron una disminución en la excreción urinaria de alantoína y creatinina con la inclusión de pasturas en dietas RTM en vacas lecheras en producción.

#### e) Síntesis

Las dietas mixtas RTM y pastura son cada vez más comunes en los sistemas productivos de bovinos. Existe consenso en que hay una disminución del consumo de MS, la producción y un peor balance energético cuando se comparan animales alimentados sólo con pastura respecto a sólo RTM. Cuando se comparan animales alimentados sólo con RTM respecto a animales alimentados con dietas mixtas los resultados no son concluyentes, ya que existen reportes de similares consumos de MS y producción, e incluso menores consumos e igual producción, respecto a dietas solo RTM.

La combinación RTM + pastura contribuye a estabilizar el ambiente ruminal respecto a dietas sólo con pastura, aunque no es tan claro respecto a dietas sólo con RTM. Si se considera la variación de PV, la glicemia y insulinemia como indicadores de estatus energético, mayoritariamente los estudios no han detectado diferencias entre animales alimentados sólo con RTM, o RTM con hasta 9h de acceso a la pastura o 30% de la MS de la dieta como pastura.

En relación al metabolismo del N no se han detectado efectos a nivel de las concentraciones de N-NH<sub>3</sub>, existiendo controversia acerca del impacto de la inclusión de pastura en dietas RTM sobre la eficiencia del uso del N. Existe consenso en que los sistemas pastoriles puros o con suplementación de concentrados energéticos son más ineficientes en el uso del N. La síntesis de proteína microbiana parece ser favorecida en las dietas mixtas (RTM y pastura) respecto a dietas RTM aunque los reportes son aún sumamente escasos.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

El estudio de cómo se afectan los procesos digestivos y el aprovechamiento metabólico de los nutrientes con sistemas alimenticios basados en pasturas templadas, ración totalmente mezclada (RTM) o mixtos, se vuelve relevante debido a la aparición y expansión de sistemas de alimentación mixtos.

La ingestión de nutrientes, el ambiente ruminal (pH y N-Nh<sub>3</sub>) y el metabolismo energético y del nitrógeno, son las principales determinantes de la producción en rumiantes sanos. Por otro lado, la información disponible es fragmentaria, abocándose algunos autores a aspectos del consumo y ambiente ruminal, otros al metabolismo intermediario del N o de la glucosa. Este estudio desarrolla una visión holística del problema, abordándolo desde todas estas ópticas en simultáneo.

La comprensión de las posibles interacciones entre la pastura y la RTM contribuirá a generar información original y relevante para el campo de la nutrición de rumiantes y la fisiología metabólica del bovino, con implicancias prácticas para los sistemas productivos intensivos y semi-intensivos de bovinos a nivel regional. Esta información contribuirá a establecer estrategias de alimentación que tiendan a maximizar la producción, en base a la utilización eficiente de nuestros recursos disponibles, minimizando los posibles impactos ambientales negativos.

En última instancia la pregunta rectora de esta tesis es: ¿ La combinación de pastura con RTM, mejora el desempeño productivo con respecto a una dieta con solamente pastura o RTM?. Además se busca comprender los procesos digestivos y metabólicos que permitan construir estrategias de alimentación que maximicen los desempeños productivos, minimicen el impacto ambiental y contribuyan a producir alimentos funcionales a la salud humana.

La **hipótesis general** de esta tesis es que la inclusión de pastura en la dieta de vaquillonas consumiendo una ración balanceada y totalmente mezclada (RTM), mejorará el aprovechamiento metabólico y digestivo de los nutrientes a través de la modificación del ecosistema ruminal, específicamente la fermentación y la síntesis de proteína microbiana.

El **objetivo general** es estudiar el consumo y el aprovechamiento digestivo de los nutrientes, el ambiente ruminal y el metabolismo energético y nitrogenado en vaquillonas alimentadas con una ración balanceada y totalmente mezclada (RTM), pastura o ambas.

Los **objetivos específicos** son estudiar el efecto de alimentar vaquillonas con una ración balanceada y totalmente mezclada (RTM), pastura o ambas sobre:

- 1) el consumo y la digestibilidad aparente de las diferentes fracciones químicas
- 2) el ambiente ruminal específicamente pH y N-Nh<sub>3</sub>
- 3) la síntesis y eficiencia de síntesis de la proteína microbiana
- 4) la uremia y retención de N
- 5) la glicemia e insulinemia
- 6) la actividad *in vitro* del inoculo ruminal medida como fermentescibilidad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se realizó entre los meses de octubre y diciembre de 2010, en la Unidad de Digestión y Metabolismo Ruminal (Departamentos de Bovinos y Nutrición) situada en el Campo Experimental N°2 de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (UdelaR), San José, Uruguay (34° latitud sur, 35° longitud oeste). Los análisis de composición química de los alimentos y heces, las determinaciones de glucosa y urea en sangre y los derivados púricos en orina se realizaron en el Laboratorio de Nutrición Animal, y los análisis de insulina fueron hechos en el Laboratorio de Técnicas Nucleares, ambos laboratorios de la Facultad de Veterinaria, UdelaR, Montevideo, Uruguay. El cuidado de los animales, la implantación de sondas ruminales y vesicales, las venopunciones yugulares y las biopsias hepáticas fueron realizadas siguiendo los protocolos aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (C.H.E.A), de la UdelaR, Uruguay.

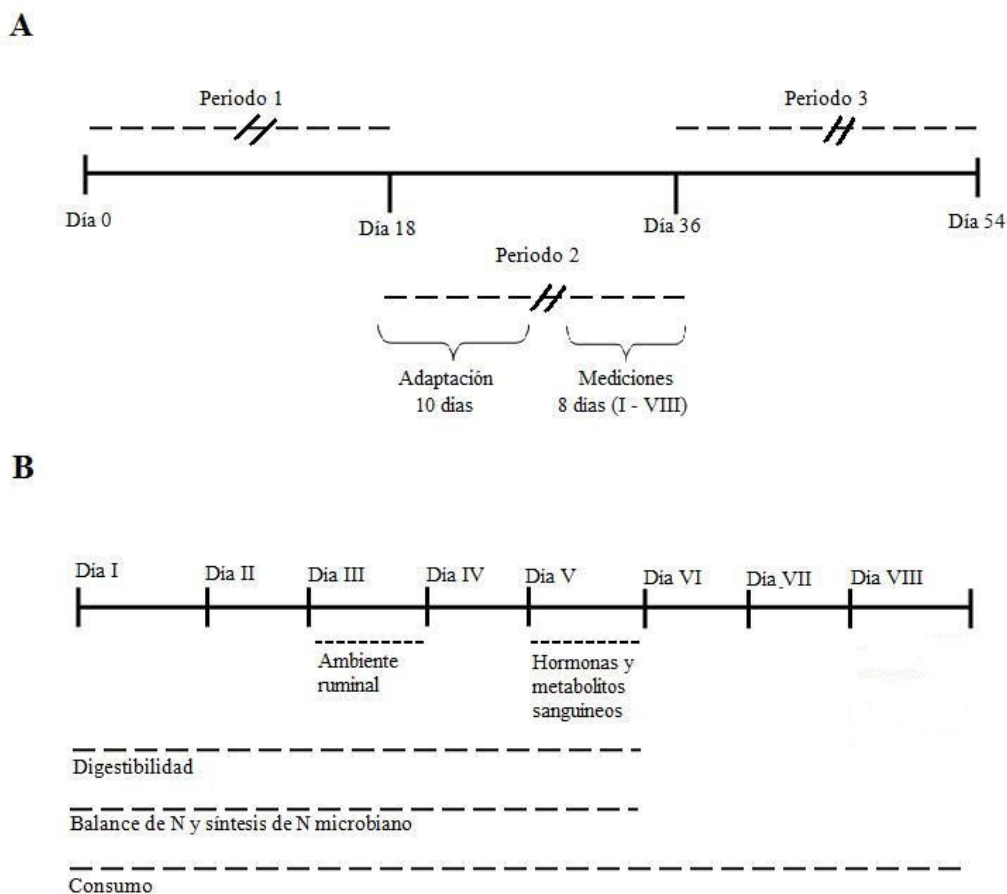
### Diseño experimental:

Se realizó un experimento “*in vivo*” el cual buscó evaluar la influencia del tipo de dieta sobre parámetros de consumo, digestibilidad de nutrientes, ambiente ruminal (pH y N-NH<sub>3</sub>), flujo de proteína microbiana al duodeno, balance nitrogenado, eficiencia en la utilización del nitrógeno, concentración plasmática de metabolitos (glucosa y urea) e insulina.

En este experimento se utilizaron nueve vaquillonas cruza (Hereford x Aberdeen Angus) (214 ± 18 kg de PV, media ± desvío estándar), fistuladas en rumen y alojadas individualmente en jaulas metabólicas. Todas las vaquillonas fueron evaluadas en tres tratamientos alimenticios donde tuvieron acceso durante:

1. 24h ración totalmente mezclada (**RTM**)
2. 24h pastura templada (**Pastura**)
3. 18h RTM + 6h de pastura (**RTM+PA**)

Durante tres períodos consecutivos de 18 días cada uno (10d de acostumbramiento y 8d de mediciones). El diseño experimental fue de tres cuadrados latinos de 3 x 3. En la **Figura 2** se presenta el esquema mediciones durante los 8 días de mediciones en cada período experimental y cuadrado latino.



**Figura 2.** Esquema del protocolo experimental: **A.** Duración total y distribución dentro de cada período; **B.** Secuencia de mediciones seguida en cada período

Los animales tuvieron acceso al agua en todo momento. Diariamente a las 1000 horas fue suministrado alimento nuevo, pastura o RTM según correspondiese. En el tratamiento RTM+PA de 1300 a 1900 horas los animales tenían acceso a la pastura, sin acceso a la RTM. Los alimentos se ofrecieron sin restricción en la cantidad, admitiendo rechazos de 5 a 20% de lo ofrecido. La composición química de la pastura, la RTM y los alimentos utilizados para formular la RTM se describen en el **Cuadro I.**

**CUADRO I.** Composición química (media  $\pm$  DE) de la pastura, la RTM y los alimentos utilizados para formular la RTM

	Pastura <sup>1</sup>	RTM <sup>2</sup>	Ensilado de sorgo PE <sup>3</sup>	Ensilado de maíz GH <sup>4</sup>	Grano de maíz molido	Harina de soja
MS (%) <sup>5</sup>	41,7 $\pm$ 17,3	58,0 $\pm$ 2,7	32,0 $\pm$ 0,1	68,40 $\pm$ 0,8	92,8 $\pm$ 0,6	89,8 $\pm$ 0,0
<i>Composición (%MS)</i>						
MO <sup>6</sup>	92,0 $\pm$ 1,2	96,2 $\pm$ 0,5	93,1 $\pm$ 0,2	97,2 $\pm$ 2,0	97,3 $\pm$ 2,7	93,2 $\pm$ 0,2
FDN <sup>8</sup>	46,6 $\pm$ 5,8	25,0 $\pm$ 6,4	62,4 $\pm$ 0,2	7,1 $\pm$ 0,3	11,6 $\pm$ 0,4	14,6 $\pm$ 1,7
FDA <sup>9</sup>	27,4 $\pm$ 0,7	12,8 $\pm$ 6,5	40,2 $\pm$ 0,2	2,0 $\pm$ 0,1	3,3 $\pm$ 0,2	5,5 $\pm$ 0,0
PB <sup>12</sup>	13,0 $\pm$ 2,1	9,2 $\pm$ 0,9	4,0 $\pm$ 0,2	7,8 $\pm$ 0,0	7,5 $\pm$ 0,0	48,8 $\pm$ 0,5
EE <sup>13</sup>	3,0 $\pm$ 0,1	3,63 $\pm$ 0,7	2,4 $\pm$ 0,1	4,2 $\pm$ 0,1	3,9 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,0
CNF <sup>11</sup>	29,4	58,5	23,9	78,1	74,4	28,3
pH	-	-	5,7	3,89	-	-
EM, Mcal/Kg MS <sup>18</sup>	2,21	2,62	-	-	-	-
<i>Fraccionamiento del N (%PB)</i>						
NNP <sup>14</sup>	21,6 $\pm$ 2,4	28,7 $\pm$ 2,2	-	-	-	-
PS <sup>15</sup>	36,5 $\pm$ 0,8	31,5 $\pm$ 3,9	-	-	-	-
NIDN <sup>16</sup>	15,4 $\pm$ 1,5	12,0 $\pm$ 1,1	-	-	-	-
NIDA <sup>17</sup>	2,8 $\pm$ 0,8	5,3 $\pm$ 0,5	-	-	-	-

<sup>1</sup> pradera mezcla disponibilidad promedio 2170  $\pm$  380 kg de MS/há (15% *Lolium multiflorum*, 63 %; *Trifolium repens*, 18,6 %; *Trifolium pratense* y 3,4 % restos muertos); <sup>2</sup> Ración totalmente mezclada; <sup>3</sup> Silo de sorgo planta entera; <sup>4</sup> Silo de maíz GH (grano húmedo); <sup>5</sup> Materia seca; <sup>6</sup> Materia orgánica; <sup>8</sup> Fibra neutro detergente; <sup>9</sup> Fibra ácido detergente; <sup>11</sup> carbohidratos no fibrosos, calculado como: %CNF = %MO - (%PB + %FDN + %EE); <sup>12</sup> Proteína Cruda; <sup>13</sup> Extracto al éter; <sup>14</sup> Nitrógeno no proteico; <sup>15</sup> Proteína soluble; <sup>16</sup> Nitrógeno insoluble en detergente neutro; <sup>17</sup> Nitrógeno insoluble en detergente ácido; <sup>18</sup> Energía metabolizable: estimado usando valores del Cornell Net Carbohydrate and Protein System v. 6.1 ® (CNCPS v.6.1)

La pastura fue cortada diariamente mediante pastera a las 0900 horas y se ofreció en comederos. Consistió en una pradera en estado vegetativo, sembrada en abril de 2009, sin recibir ningún tipo de fertilización hasta su utilización en el ensayo. La composición botánica se estimó el primer y último día de cada periodo experimental y en promedio durante el experimento presentó una composición (en MS) de 15,0 % de raigrás (*Lolium multiflorum*), 63,0 % de trébol blanco (*Trifolium repens*), 18,6 % de trébol rojo (*Trifolium pratense*) y un 3,4 % de restos muertos, con una disponibilidad promedio de 2170  $\pm$  380 kg de MS/há.

La RTM se formuló de acuerdo a las recomendaciones de Cornell Net Carbohydrate and Protein System v. 6.1 ® (CNCPS v.6.1), para cubrir por sí misma en forma balanceada los requerimientos de animales de 200 Kg de peso vivo y una ganancia de 1 kg diario. Para la RTM se utilizó silo de sorgo planta entera, silo de grano húmedo de maíz, grano de maíz seco molido y harina de soja peleteada como componentes principales. Además se agregó un núcleo vitamínico mineral conteniendo fosfato di cálcico, carbonato de calcio, complejo vitamínico y oligo mineral (DSM®), bicarbonato de sodio como buffer y óxido de magnesio como



alcalinizante. En el **Cuadro II** se detalla la participación porcentual en MS de cada componente de la RTM.

**CUADRO II.** Participación porcentual en MS de cada componente de la RTM.

<b>Ingredientes</b>	<b>(% MS)</b>
Silo de sorgo planta entera	25,2
Silo grano húmedo de maíz	40,4
Grano de maíz molido	24,2
Harina de soja peleteada	8,1
Vitamina - Mineral Premix DSM <sup>1</sup>	0,02
Bicarbonato de sodio	0,65
Oxido de magnesio	0,32
Fosfato di cálcico	0,65
Carbonato de calcio	0,48

<sup>1</sup> Vitaminas: vitamina A 50: UI; vitamina D 1000: UI; vitamina E 20000 UI; Mg 72000 mg/kg; Mn 30000 mg/kg; Fe 80000 mg/kg; Zn 50000 mg/kg; Cu 14000 mg/kg; I 20000 mg/kg; Se. Minerales: Tot 95 - 97%; Ca 10 -13%; P 8 -10%; Rel Ca/P 1,28 -1; Se 16mg/Kg; Cu 480 mg/Kg; Zn 1800 mg/Kg; Cen insolubles 4,5%; F o,2%; Cd 5 ppm; Cr 2 ppm; As 12 ppm; Pb 30 ppm; Hg 0,1 ppm

## **Determinaciones, cálculos y técnicas.**

### Análisis químicos:

En los alimentos y heces de cada animal en cada período se analizó el contenido en MS, MO y PB (%N  $\times$  6,25) según AOAC (Official Methods of Analysis, AOAC International, 1990), así como FDN y FDA de acuerdo con la técnica descrita por Goering y Van Soest et al. (1970), modificada por Robertson y Van Soest (1981), usando un analizador de fibra Ankom220 (Ankom Technology Corp. Fairport, NY, USA). El nivel de CNF fue determinado como: %MO - (%PB + %FDN + %EE). Todas las muestras se analizaron por triplicado, aceptando coeficientes de variación entre análisis del 3 al 5% según el parámetro.

A efectos descriptivos se analizó en un pool por período (compuesto por muestras de cada día en iguales proporciones) para la pastura y RTM por separado, donde se realizó el fraccionamiento de los compuestos nitrogenados según el método propuesto por Licitra et al. (1996). Para estas determinaciones se aceptaron coeficientes de variación menores al 10%.

Consumo y Digestibilidad : El consumo se determinó para cada animal, período y tratamiento durante 8 días, por medición de los Kg de alimento ofrecidos y rechazados. Todos los días se tomaron muestras de la pastura y RTM ofrecidas a los animales, así como el rechazado cuando superó el 20 % de lo ofrecido. Durante los primeros 5 días de cada período de medición se colectó y pesó la totalidad de las heces producidas por cada animal, tomándose una alícuota diaria del 10% para análisis químicos. Todas las muestras se conservaron a -20° C hasta su análisis. Posteriormente se analizaron los contenidos de MS, MO, PB, FDN y FDA en los alimentos y las heces de cada animal. A partir de estos datos se calcularon los coeficientes de digestibilidad aparente (**CD**) para cada una de las fracciones químicas indicadas como:

$$(A-B)/A*100$$

En donde A corresponde a la cantidad ingerida (g/d) del nutriente y B a la cantidad eliminada (g/d) en heces del nutriente. La MODI se calculó como la MO ingerida (Kg) por su CD.

Retención de nitrógeno : Además de las heces producidas se colectó la orina total diaria de cada animal durante 5 días por período, mediante sondaje uretral, sobre una solución conservante (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10%); del volumen total se extrajo una alícuota proporcional a lo excretado y se diluyó hasta un volumen final de 50 ml para su conservación a -20 °C. Se conformó un pool de orina por animal y período respetando las proporciones de micción diarias. La concentración de N en orina se estimó por destilación directa. La retención de nitrógeno (**RN**) se calculó como:

$$RN = NI - (Nh + No)$$

donde NI corresponde al nitrógeno ingerido (g/d), Nh al nitrógeno eliminado en heces (g/d) y No al nitrógeno eliminado en orina (g/d).

Síntesis y eficiencia de síntesis de proteína microbiana : La SPM se estimó en forma indirecta, a partir de la eliminación de los derivados púricos (alantoína y ácido úrico)

en orina. Se colectó el volumen total de orina producido en la forma antes descrita (ver balance de N) durante 5 días por animal y período. Cada muestra de orina (480 µL) fue analizada para determinar la concentración de xantina, hipoxantina, ácido úrico y alantoína por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (Ultimate 3000, Dionex Corporation, Sunnyvale, USA), según Balcells et al., 1992, utilizando como estándar interno Alopurinol (20 µL/ muestra). Se realizó la equilibración del equipo con Buffer A (100 ml de solución 0.1 M de NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en 900ml de agua bidestilada, pH a 4.0) durante 10 min y luego un flujo isocrático de 0 a 100% de Buffer B (100 ml de solución 0.1 M de NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en 700 ml de agua pH 4.0 y 200 mL de acetonitrilo) durante 12 min con un flujo de 0.8 mL/ min. La lectura se realizó a 205 nm (Columna PROD, COL, ACCLAIM, C18, 5 UM, 4.6 x 250 MM).

Los derivados púricos totales se determinaron como la suma de ácido úrico y alantoína. La cantidad de purinas absorbidas (X, mmol/día) correspondiente a la cantidad de purinas excretadas (Y, mmol/día, considerando 158 mg/mmol de alantoína y 168 mg/mol de ácido úrico) fue calculada en base a la ecuación descrita por Chen y Gomes (1995):

$$X = Y - (0,385 PV^{0,75}) / 0,85.$$

La SPM se calculo como:

$$SPM \text{ (g/día)} = 70X / 0,116 \times 0,83 \times 1000 = 0,727X,$$

asumiendo una digestibilidad de las purinas microbianas de 0.83, un contenido de N en las purinas de 70 mgN/mmol y una relación N de purinas/N total de 0,116. (Chen y Gomes, 1995).

La **ESPM**, se calculó como: g de SPM por kg de MODI (ESPM = g SPM/kg MODI). La eficiencia de uso del N ingerido para la SPM (**EUN**) fue estimada como los g de SPM divididos los g de N ingerido (EUN = g SPM/g N ingerido).

Parámetros de fermentación ruminal : La obtención de muestras de líquido ruminal se realizó el día 3 de cada período de medición, mediante una sonda ruminal permanente como describen Aguerre et al. (2008). En estas muestras se determinó cada hora, durante 24 horas consecutivas, el pH y la concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) en el rumen. El pH fue medido en forma inmediata a la extracción de líquido ruminal mediante pHmetro digital (Cole Parmar Instrument Company, # 59002-00, Singapore). Una muestra para determinación de amoníaco se conservó con NaCl al 5% y fue almacenada a -20°C, y *a posteriori* se determinó la concentración de N-NH<sub>3</sub> por destilación directa en un destilador (TECATOR, 1002 Kjeltex Sysem).

Parámetros sanguíneos : Se extrajeron 4 muestras sanguíneas por animal y período, durante el quinto día de muestreo, inmediatamente antes del recambio diario de alimentos a la hora 0 (1000 h), y luego a las 2, 4 y 8 horas a partir de la hora 0. Las muestras para glucosa y urea se obtuvieron en tubos de 10 ml con 1 ml de anticoagulante G (Wiener laboratorios SACI; Riobamba 2944, S2003GSD Rosario, Argentina; REF: 1890552), fueron centrifugadas inmediatamente (3000 rpm, 15 min) y se conservaron dos microtubos de 1,5 ml de plasma a -20°C. Las concentraciones de glucosa y urea se determinaron mediante colorimetría usando un kit comercial (BioSystems S.A., Costa Brava 30, Barcelona, España) para cada uno,

y un espectrofotómetro (UNICO<sup>®</sup>, 1200). Para la glucosa el límite de detección fue de 0,23 mg/dL de glucosa y el coeficiente de variación intraensayo para el control 1 (74 a 100 mg/dL) y el control 2 (242 a 327 mg/dL) fueron 6,4 y 5,9 % respectivamente. Por otro lado para la urea el límites de detección fue de 1,3 mg/dL y el coeficiente de variación intraensayo para el control 1 (5- 51 mg/dl) y el control 2 (102 – 237 mg/dL) fueron 4,1 y 1,8 % respectivamente.

Las muestras para determinación de insulina se obtuvieron en tubo seco de 10 ml y se dejó retraer el coágulo como mínimo 6 horas, luego se centrifugaron (3000 rpm, 10 min) y extrajo el sobrenadante, conservándose dos microtubos de 1,5 ml a -20°C. Las concentraciones de insulina se determinaron usando un ensayo inmunoradiométrico de un kit comercial (DIAsource Immuno Assays S.A, Nivelles, Belgica). La sensibilidad del ensayo fue 1,7 µUI/mL. Las muestras se analizaron en dos ensayos y el coeficiente de variación intraensayo para el control 1 (25 µUI/mL) y el control 2 (61 ng/mL) fueron 4,9 % y 7,5 %. Los coeficientes de variación interensayo para los mismos controles fueron 5,7% y 7,0% respectivamente.

#### Análisis Estadísticos:

Los datos fueron analizados mediante el Sas System for Windows 9.0<sup>®</sup>. El modelo estadístico utilizado para consumo, digestibilidad, SPM, ESPM y balance de nitrógeno fue:

$$Y_{ijk} = \mu + C_i + P(c)_j + T_k + e_{ijk}$$

Mientras que para las variables con medidas repetidas en el tiempo: glucosa, urea, glocagon, insulina, pH y NH<sub>3</sub> el modelo fue:

$$Y_{ijkl} = \mu + C_i + P(c)_j + T_k + H_l + T_k \times H_l + e_{ijkl}$$

Siendo:

$Y_{ijkl}$  = la variable en estudio

$\mu$  = media

$C_i$  = efecto fijo del cuadrado

$P(c)_j$  = efecto fijo del período anidado al cuadrado

$T_k$  = efecto fijo del tratamiento

$H_l$  = efecto fijo hora

$H_l + T_k$  = efecto fijo de la iteración tratamiento hora

$e_{ijkl}$  = error residual

Las medias se separaron con el test de Tukey, declarándose significancias con  $P < 0, 05$ .

## RESULTADOS

El consumo diario de, MS, MO y los componentes no nitrogenados de la dieta para los diferentes tratamientos se presentan en el **Cuadro IV**. El consumo de MS y MO fue menor para el tratamiento Pastura respecto a RTM+PA, no detectándose diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos RTM y RTM+PA. Cuando se expresó el consumo total de MS como % PV existió una tendencia ( $p=0,0685$ ) a ser mayor en RTM+PA comparado con RTM. Cuando las vaquillonas tuvieron acceso a ambos alimentos en el tratamiento RTM+PA consumieron (en materia seca) un promedio del 29% como pastura y un 71% como RTM.

**CUADRO III.** Consumo diario de MS, MO y los componentes no nitrogenados de la dieta, en vaquillonas alimentadas con RTM, pastura o ambos.

Item	Tratamientos <sup>1</sup>			EEM <sup>2</sup>	Efecto <sup>3</sup>	
	RTM	RTM+PA	Pastura		T	p
<i>Consumo MS g/d</i>						
Pastura	0	2131	5487	-	-	-
RTM	5986	5218	0	-	-	-
Total	5986 <sup>ab</sup>	7358 <sup>a</sup>	5487 <sup>b</sup>	562	0,042	0,457
MS Total % PV	2,8 <sup>abx</sup>	3,4 <sup>ay</sup>	2,7 <sup>b</sup>	0,26	0,008	0,285
<i>Consumo MO g/d</i>						
Pastura	0	1960	5130	-	-	-
RTM	5837	5050	0	-	-	-
Total	5837 <sup>ab</sup>	7019 <sup>a</sup>	5130 <sup>b</sup>	546	0,040	0,399
<i>Consumo total g/d</i>						
FDN	1575 <sup>b</sup>	2339 <sup>a</sup>	2573 <sup>a</sup>	209	0,004	0,474
FDA	804 <sup>b</sup>	1241 <sup>a</sup>	1478 <sup>a</sup>	121	0,001	0,591

<sup>1</sup>RTM (24h RTM); RTM+PA (18h RTM y 6h pastura); Pastura (24h pastura); <sup>2</sup>EEM: Error estándar de la media (n = 9 por tratamiento); <sup>3</sup> T: efecto del tratamiento; P: efecto del período experimental.

MS: materia seca; MO: materia orgánica; PV: peso vivo; FDN: fibra detergente neutro; FDA: fibra ácido detergente

Diferentes letras (a-b) en una misma fila difieren  $p<0,05$  entre tratamientos.

Diferentes letras (x-y) en una misma fila indica tendencia ( $p<0,10$ ) entre tratamientos.

La digestibilidad de las diferentes fracciones químicas se presenta en el **Cuadro V**. No se detectaron diferencias en la digestibilidad de la MS y MO entre los tratamientos. Sin embargo, la digestibilidad de la fibra (FDA y FDN) fue mayor para el tratamiento Pastura respecto a los otros dos tratamientos.

**CUADRO IV.** Coeficiente de digestibilidad aparente (CD) de la MS y los componentes no nitrogenados de la dieta, en vaquillonas alimentadas con RTM, pastura o ambos.

CD	Tratamientos			EEM	Efecto	
	RTM	RTM+PA	Pastura		T	p
MS	0,66	0,71	0,73	0,023	0,166	0,258
MO	0,71	0,74	0,75	0,017	0,329	0,324
FDN	0,42 <sup>b</sup>	0,46 <sup>b</sup>	0,61 <sup>a</sup>	0,036	0,014	0,414
FDA	0,31 <sup>b</sup>	0,35 <sup>b</sup>	0,55 <sup>a</sup>	0,056	0,028	0,342

RTM: 24h RTM; RTM+PA: 18h RTM y 6h pastura; Pastura: 24h pastura; EEM: Error estándar de la media (n = 9 por tratamiento); T: efecto del tratamiento; P: efecto del período experimental.

MS: materia seca; MO: materia orgánica; FDN: fibra detergente neutro; FDA: fibra ácido detergente. Diferentes letras en una misma fila difieren  $p < 0,05$  entre tratamientos.

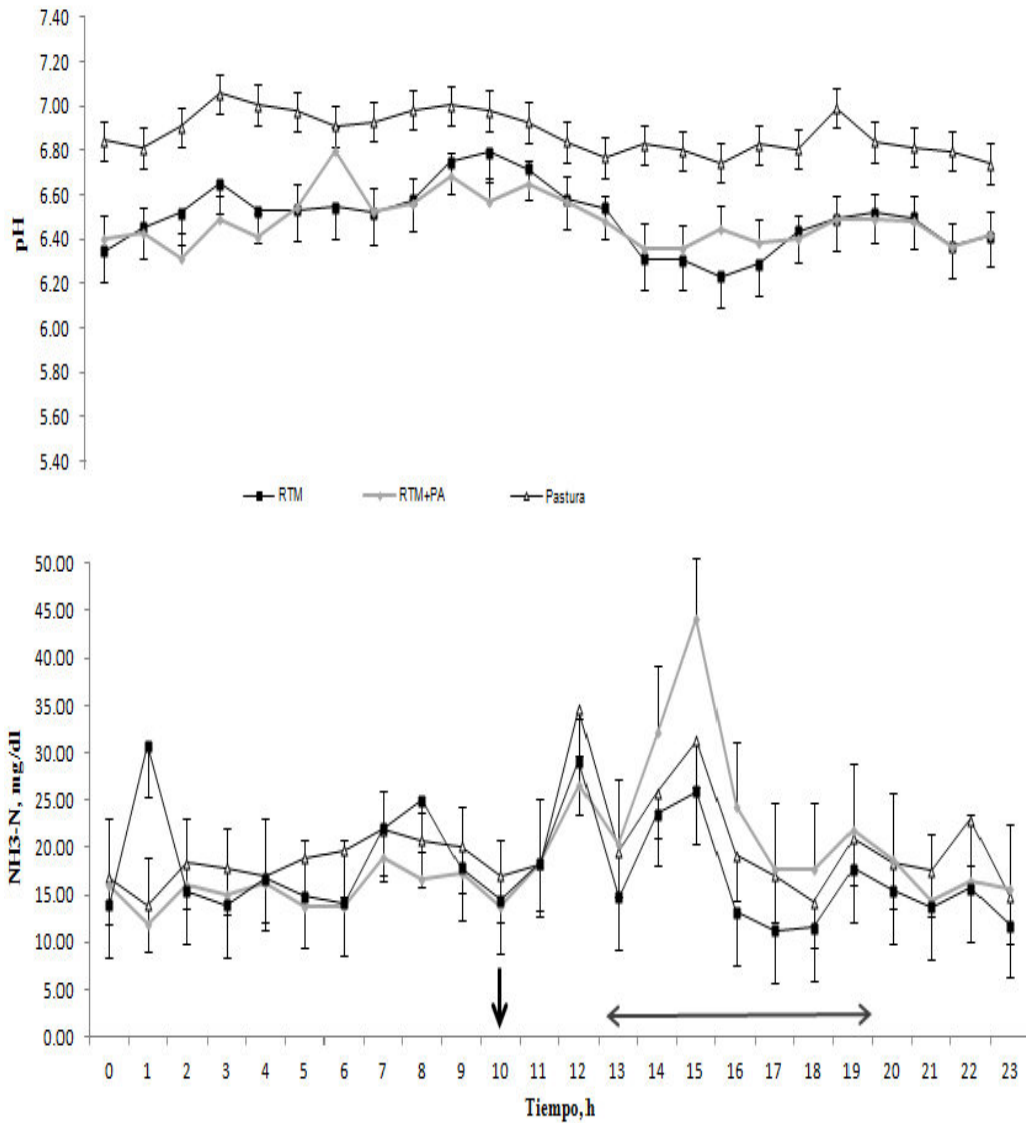
Los valores medios de pH y N-NH<sub>3</sub> se presentan el **Cuadro VI** y las dinámicas diarias de ambas variables se muestran en la **Figura 3**. Los valores de pH fueron mayores para los animales del tratamiento pastura respecto a los de los otros dos tratamientos. Se detectó efecto de la hora de muestreo, las dinámicas fueron similares para los distintos tratamientos siendo los valores más alcalinos en la mañana a las 3 AM, 6 AM y 10 AM para los tratamientos Pastura, RTM+PA y RTM respectivamente. Los rangos de pH y desvío estándar (DE) para los tres tratamientos fueron: Pastura (6,74 a 7,05; DE = 0,092), RTM+PA (6,32 a 6,80; DE=0,111) y RTM (6,23 a 6,80; DE=0,141). Las concentraciones medias de N-NH<sub>3</sub> no difirieron estadísticamente entre los distintos tratamientos. Se detectó efecto de la hora del día y el período experimental. Las concentraciones para los tres períodos experimentales (medias ± EEM) fueron: período I (27,68 ± 1,991), período II (18,22 ± 1,991) y período III (10,92 ± 1,991). Los rangos de N-NH<sub>3</sub> y desvío estándar para los tres tratamientos fueron: Pastura (13,9 a 34,5; DE = 4,85), RTM+PA (11,9 a 44,1; DE=6,98) y RTM (11,5 a 30,8; DE= 5,56). Para el tratamiento RTM+PA, los picos máximos (44,1 mg/dl) se alcanzaron a la 15h (hora reloj), dos horas después de comenzar el suministro de pastura en este tratamiento.

**CUADRO V.** Valores medios de pH y concentraciones de N-NH<sub>3</sub> en vaquillonas alimentadas con RTM, pastura o ambos.

	Tratamientos			EEM	Efecto			
	RTM	RTM+PA	Pastura		T	P	H	TxH
pH	6,51 <sup>a</sup>	6,46 <sup>a</sup>	6,87 <sup>b</sup>	0,042	< 0,001	0,108	0,027	0,946
NH <sub>3</sub> (mg/dL)	17,6	19,3	19,9	1,11	0,240	<0,001	<0,001	0,867

RTM: 24h RTM; RTM+PA: 18h RTM y 6h pastura; Pastura: 24h pastura; EEM: Error estándar de la media (n = 9 por tratamiento); T: efecto del tratamiento; P: efecto del período experimental; H: efecto de la hora y TxH: interacción hora por tratamiento.

Diferentes letras en una misma fila difieren  $p < 0,05$  entre tratamientos.



**Figura 3.** Dinámicas diarias de pH y N-NH<sub>3</sub> ruminal en vaquillonas alimentadas con: RTM (24h), RTM+PA (18h RTM+ 6h pastura) o Pastura (24h), (medias  $\pm$  desvío estándar; n = 9). La flecha vertical (negra) indica el cambio diario de alimentos; la flecha horizontal (gris) indica el horario de acceso a la pastura en el tratamiento RTM+PA.

Las concentraciones medias y el error estándar para cada tratamiento para los parámetros sanguíneos estudiados (insulina, glucosa y urea) se presentan en el **Cuadro VII**. Los menores niveles de insulina se observaron para el tratamiento Pastura, detectándose una tendencia ( $p=0,069$ ) de los animales del tratamiento RTM a presentar mayores concentraciones de insulina que los del tratamiento RTM+PA. Existió efecto del período experimental, siendo la concentración sérica de insulina (media  $\pm$  desvío estándar) para cada período de: período I ( $32,4 \pm 20,9 \mu\text{UI/ml}$ ); período II ( $29,6 \pm 6,8 \mu\text{UI/ml}$ ) y período III ( $32,2 \pm 11,5 \mu\text{UI/ml}$ ). Para los valores medios de glucosa en sangre se detectó efecto del período experimental, la hora de muestreo e interacción tratamiento por hora. Para esta variable, los valores fueron menores para el tratamiento Pastura respecto a RTM y RTM+PA, y la concentración plasmática (media  $\pm$  desvío estándar) para cada período fue: período I ( $90,4 \pm 12,2 \text{ mg/dL}$ ), período II ( $64,2 \pm 5,1 \text{ mg/dL}$ ) y período III ( $84,4 \pm 7,2 \text{ mg/dL}$ ). En la

**Figura 4** se muestra la dinámica de las concentraciones de glucosa por tratamiento a las 10, 12, 14 y 18h. La evolución de la glicemia fue diferente entre los tratamientos. El tratamiento Pastura presentó un aumento lineal de la glicemia en función del tiempo, el tratamiento RTM presentó un comportamiento cuadrático, con un máximo a la hora 2 y posterior descenso. El tratamiento RTM+PA presentó una evolución similar al tratamiento RTM pero a partir de la hora 4 se mantuvo en un plateau hasta la hora 8. Los rangos de datos y desvíos estándar de cada tratamiento fueron: RTM (68,5 a 96,3 mg/dL; DE = 11,62 mg/dL), RTM+PA (67,1 a 106,1 3 mg/dL; DE = 15,92 mg/dL) y Pastura (67,9 a 79,7 mg/dL; DE = 10,27 mg/dL). Las concentraciones plasmáticas de urea fueron menores en los tratamientos RTM y RTM+PA respecto al tratamiento Pastura. No se detectó efecto de la hora de muestreo, ni interacción tratamiento por hora.

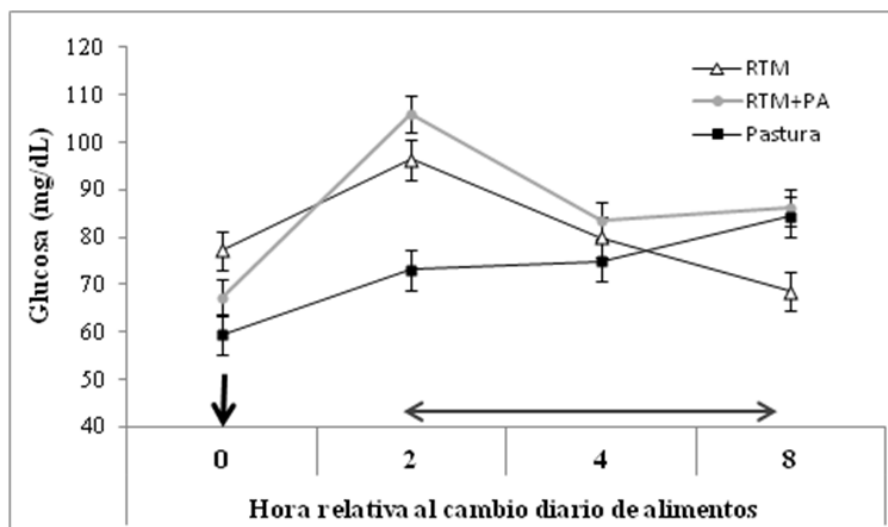
**CUADRO VI.** Concentración media de metabolitos (glucosa y urea) y hormonas sanguíneas (insulina y glucaón) en vaquillonas alimentadas con RTM, pastura o ambos.

	Tratamientos			EEM	Efectos			
	RTM	RTM+PA	Pastura		T	P	H	TxH
<b>Insulina</b> ( $\mu$ UI/ml)	44.5 <sup>ax</sup>	32.1 <sup>ay</sup>	17.7 <sup>b</sup>	6.24	0.0007	0.011	0.5504	0.9291
<b>Glucosa</b> (mg/dL)	80.5 <sup>ab</sup>	85.7 <sup>a</sup>	73.0 <sup>b</sup>	4.23	0.024	<0.0001	0.001	0.045
<b>Urea (mg/dL)</b>	27.4 <sup>b</sup>	28.0 <sup>b</sup>	39.0 <sup>a</sup>	9.35	0.002	0.816	0.152	0.332

RTM: 24h RTM; RTM+PA: 18h RTM y 6h pastura; Pastura: 24h pastura; EEM: Error estándar de la media (n = 9 por tratamiento); T: efecto del tratamiento; P: efecto del período experimental; H: efecto de la hora y TxH: interacción hora por tratamiento.

Diferentes letras (a-b) en una misma fila difieren  $p < 0,05$  entre tratamientos.

Diferentes letras (x-y) en una misma fila indica tendencia ( $p < 0,10$ ) entre tratamientos.



**Figura 4.** Concentraciones de glucosa a las 10 AM (0h), 12 AM (2h), 14 PM (4h) y 18 PM (8h), en vaquillonas alimentadas con: RTM (24h), RTM+PA (18h RTM+ 6h pastura) o Pastura (24h) (medias  $\pm$  desvío estándar; n = 9). La flecha vertical (negra) indica el cambio diario de alimentos (10 AM); la flecha horizontal (gris) indica el horario de acceso a la pastura en el tratamiento RTM+PA (13 PM a 19 PM).



En el **Cuadro VIII** se presenta el consumo y la digestibilidad de las fracciones nitrogenadas, la retención de nitrógeno y la síntesis de proteína microbiana para los animales en los distintos tratamientos. No se detectaron diferencias en el consumo y la eliminación del N en heces entre los tratamientos. Los animales del tratamiento Pastura eliminaron mayor cantidad de N por orina que los de los tratamientos RTM y RTM+PA. La digestibilidad aparente del N fue menor en el tratamiento RTM respecto al tratamiento Pastura y presentó una tendencia ( $p=0,065$ ) a ser menor en el tratamiento RTM respecto al tratamiento RTM+PA. Para esta variable se detectó efecto del período experimental, siendo la digestibilidad aparente para cada período (media  $\pm$  EEM): período I ( $71,8 \pm 4,11\%$ ), período II ( $63,7 \pm 4,11\%$ ) y período III ( $72,9 \pm 4,11\%$ ). La retención de N presentó una tendencia a ser menor en el tratamiento RTM respecto al tratamiento Pastura ( $p = 0,065$ ) y al tratamiento RTM+PA ( $p = 0,092$ ).

La SPM fue menor para el tratamiento Pastura en comparación con los otros dos tratamientos. La MODI tendió a ser mayor en el tratamiento RTM+PA comparado con Pastura. La ESPM y EUN tendieron a ser mayores para el tratamiento RTM respecto al tratamiento Pastura, no detectándose diferencias entre RTM+PA y los otros dos tratamientos.

**CUADRO VII.** Consumo y digestibilidad de las fracciones nitrogenadas, retención de nitrógeno y síntesis de proteína microbiana en vaquillonas alimentadas con RTM, pastura o ambos.

	Tratamientos			EEM	Efecto	
	RTM	RTM+PA	Pastura		T	P
Consumo N (g/d)	93,26	124,12	116,69	10.456	0,1435	0,6030
<i>Excreción de N:</i>						
N Heces (g/d)	33,5	37,42	26,61	3,27	0,1029	0,4251
N Orina (g/d)	6.7 <sup>b</sup>	7.9 <sup>b</sup>	13.9 <sup>a</sup>	1,47	0,0127	0,1243
N Orina como % del N Tot. <sup>1</sup>	17 <sup>b</sup>	17 <sup>b</sup>	31 <sup>a</sup>	2.9	0,0078	0,2680
Digestibilidad aparente N (%)	61b <sup>ax</sup>	70 <sup>aby</sup>	77 <sup>a</sup>	2,4	0,0025	0,0447
Retención de N (%)	53 <sup>y</sup>	79 <sup>x</sup>	76 <sup>xy</sup>	50,0	0,073	0,4797
<i>Síntesis de proteína microbiana:</i>						
SPM (Ng/día) <sup>2</sup>	100.6 <sup>a</sup>	105.6 <sup>a</sup>	64.9 <sup>b</sup>	8,90	0,018	0,382
MODI (kg/d) <sup>3</sup>	4,2 <sup>xy</sup>	5,1 <sup>x</sup>	3,9 <sup>y</sup>	0,38	0,083	0,295
ESPM (g SPM/Kg MODI) <sup>4</sup>	26.7 <sup>a</sup>	20.7 <sup>ab</sup>	17.1 <sup>b</sup>	5,21	0,034	0,061
EUN (g SPM/g N ingerido) <sup>5</sup>	1,0 <sup>a</sup>	0.84 <sup>b</sup>	0.55 <sup>c</sup>	0,06	<0.001	0,1952

RTM: 24h RTM; RTM+PA: 18h RTM y 6h pastura; Pastura: 24h pastura; EEM: Error estándar de la media (n = 9 por tratamiento); T: efecto del tratamiento; P: efecto del período experimental.

<sup>1</sup> % del N excretado por orina del total excretado

<sup>2</sup> Síntesis de proteína microbiana

<sup>3</sup> Materia orgánica digestible ingerida

<sup>4</sup> Eficiencia de síntesis de proteína microbiana

<sup>5</sup> Eficiencia de uso del N para síntesis de proteína microbiana

Diferentes letras (a-b) en una misma fila difieren  $p<0,05$  entre tratamientos.

Diferentes letras (x-y) en una misma fila indica tendencia ( $p<0,10$ ) entre tratamientos.

## DISCUSIÓN

### COMPOSICION QUÍMICA DE LOS ALIMENTOS

La variación en la composición química de los alimentos en los diferentes períodos no fue relevante a excepción de los niveles de MS, PB, FDN y FDA de la pastura que evolucionaron acorde con el Índice de Vegetación Diferencia Normalizada (IVDN) para la zona y la época (GRAS - INIA). En el **Cuadro IX** se desglosa por periodo como evoluciono la composición química de la pastura. Con el aumento de los contenidos de MS en la pastura aumentaron los contenidos de fibra y disminuyó la PB. De todas formas, estas variaciones no influyeron en el consumo o en la digestibilidad de estas fracciones químicas ya que no existió un efecto período para estas variables. Los niveles de fibra del forraje utilizado coinciden con los reportados por Bargo et al. (2003) para pasturas templadas (40-50% de FDN). Sin embargo, los niveles de N están por debajo del rango citado por el mencionado autor para este tipo de pasturas (18 vs 24 %PB), lo que probablemente sea debido a la ausencia de fertilización de la pastura desde su implantación. La fracción de nitrógeno no proteico (que comprende péptidos, aminoácidos, aminos, amidas y nitratos) se ubico dentro del rango de 15 a 25 % del nitrógeno total establecido por Mangan, (1982).

**CUADRO VIII.** Composición química media y error estándar (ES) de la pastura en los diferentes períodos.

	Período			ES	p <sup>1</sup>
	I	II	III		
MS (%)	25,1 <sup>a</sup>	38,6 <sup>a</sup>	56,4 <sup>b</sup>	4,11	0,004
<i>Composición (%MS)</i>					
MO	92,3	92,3	91,5	0,41	0,329
PB	15,2 <sup>a</sup>	12,5 <sup>b</sup>	11,6 <sup>b</sup>	0,59	0,003
FDN	42,4 <sup>a</sup>	46,9 <sup>ab</sup>	50,3 <sup>b</sup>	2,03	0,059
FDA	23,7 <sup>a</sup>	27,4 <sup>b</sup>	31,3 <sup>c</sup>	0,88	<0,001

p<sup>1</sup>: efecto del período experimental.

MS: materia seca; MO: materia orgánica; FDN: fibra detergente neutro; FDA: fibra acido detergente

Por su parte la RTM lograda (58% MS, 25% FDN, 12 % FDA y 9 % PB), en general fue similar a la formulada mediante el CNCPS v. 6.1 (57% MS, 22% FDN, 11% FDA y 12% PB). Sin embargo, el contenido de PB que fue menor en la dieta suministrada respecto al formulado, debido al menor contenido de nitrógeno en los insumos utilizados, particularmente el silo de planta entera de sorgo. Igualmente el valor más bajo de N-NH<sub>3</sub> en rumen fue 11,26 mg/dL, mayor al valor umbral (8 mg/dL) por debajo del cual se comprometería la síntesis de proteína microbiana (Van Soest et al., 1994).

En todos los tratamientos los niveles de fibra determinados y fibra efectiva calculados estuvieron por encima de las recomendaciones mínimas para bovinos de estas características según NRC, (1996). Por su parte los contenidos de CNF sugieren una buena disponibilidad de carbohidratos de fácil fermentación en rumen en todas las dietas.

## CONSUMO Y DIGESTIBILIDAD

El consumo previsto por el programa CNCPS v. 6.1 para la RTM y animales de características similares a los utilizados en el experimento fue de 5,39 kg MS/animal/d, mientras que el observado experimentalmente fue 5,98 kg MS/animal/d. Como era esperado, el consumo en kg de MS y MO observado para el tratamiento Pastura fue inferior al alcanzado por los otros dos tratamientos (Cuadro IV).

El modelo de vaca lechera en lactación es el modelo animal en que se ha generado la mayoría de la información disponible en esta temática. Trabajando con esta categoría de animales, Schroeder et al., (2005) utilizando verdeos de invierno (*Avena sativa*) o Kolver y Muller., (1998) utilizando una pradera mezcla (53% *Lolium perenne*, 19% *Trifolium repens* y 21% otras gramíneas), reportaron un mayor consumo en animales consumiendo sólo RTM respecto a solo pastura. Contrariamente, en el presente trabajo el consumo de MS y MO de los animales alimentados solo con pastura no difirió estadísticamente de los animales alimentados únicamente con RTM. El hecho que este trabajo haya utilizado un modelo animal (vaquillonas en crecimiento) de menor demanda nutricional que las vacas lecheras en producción podría explicar las diferencias entre este experimento y los antes citados. En este sentido, Charlton et al., (2011) al determinar la preferencia de vacas lecheras en lactación por RTM o pastura (*Lolium multiflorum* y *Trifolium repens*, disponibilidad 3000 kg MS/ha) reportaron una preferencia parcial por la RTM, que sería influenciada por las altas demandas de nutrientes de los animales. En el presente experimento, el tratamiento RTM consumió en MS un 65% de su dieta como grano de maíz ya sea seco o ensilado húmedo, que presenta una digestibilidad teórica cercana al 85% (Sniffen et al., 1992). Por su parte los forrajes en general presentan valores de digestibilidad muy variables (35 a 80 %; Minson, 1990). La alta digestibilidad de la MO (75%) así como una mayor digestibilidad de la fibra en la pastura utilizada en este experimento (Cuadro V), justifican en parte la ausencia de diferencias entre el tratamiento RTM y Pastura.

La inclusión de 6 h de pastura en la dieta de vaquillonas consumiendo RTM aumentó el consumo respecto al tratamiento Pastura y no deprimió el consumo respecto al tratamiento RTM. No se encontraron diferencias entre los consumos de MS y MO entre RTM y RTM+PA coincidiendo con los resultados de (Vibart *et al.*, 2008; Morales *et al.*, 2010; Mendoza, 2012a) quienes no encontraron diferencia entre el consumo de vacas lecheras en producción consumiendo únicamente RTM o RTM y 4 o 6 horas de pastura. Para el tratamiento RTM+PA, si consideramos la RTM como dieta de base y la pastura como suplemento, existió una respuesta de adición con sustitución (Viglizzo E., 1981). La tasa de sustitución definida por Kellaway y Porta, (1993) como los kg de RTM que deja de comer por cada kg pastura que consume fue en MO de 0,40.

Parece poco probable que el tratamiento RTM hubiera detenido su consumo por ingestión suficiente de energía, ya que la ingesta total de EM del tratamiento RTM+PA fue mayor que la del tratamiento RTM (ver más adelante metabolismo energético). Por su parte, los niveles de fibra consumidos parecen insuficientes para atribuirles acciones de llenado que limitaran el consumo de alimentos. La cantidad de FDN consumida fue 1,5; 2,3 y 2,6 kg para los tratamientos RTM, RTM+PA y Pastura, respectivamente, siendo los animales de este último los que realizaron las

mayores ingestiones de FDN, equivalentes al 1,07 % de su PV. Además, la digestibilidad de las fracciones fibrosas fue mayor para el tratamiento Pastura ( $p < 0,05$ ) respecto a los otros tratamientos. Esto es consistente con los mayores valores de pH (6,87) que presenta el tratamiento Pastura, siendo este cercano al valor establecido como óptimo para el desarrollo de la flora celulolítica (Bryant, M. 1959), pudiendo esto haber contribuido a una mayor degradabilidad de la fibra. Estas diferencias podrían deberse a características de la capacidad fermentativa de la microbiota ruminal y/o aspectos intrínsecos de la fibra (pastura vs ensilado de sorgo de planta entera) como los niveles de lignificación que habrían contribuido a estas diferencias.

En los animales del tratamiento RTM+PA se observaron altos consumos de MS: 22% más que para el tratamiento RTM y 25% más que para el tratamiento Pastura. La tendencia a un mayor consumo ( $p = 0,068$ ) para el tratamiento RTM+PA respecto al RTM cuando se expresa como % de PV, podría estar relacionada con factores nutricionales (digestibilidad, ambiente ruminal, bacteriología ruminal) y efectos asociativos entre la pastura y la RTM. Este mayor consumo también podría ser atribuido a factores comportamentales (tiempo de ingestión, tasa de ingestión, entre otros) debidas a las preferencias, a la palatabilidad y a características organolépticas de los alimentos, que no fueron registrados en este experimento. En este sentido, datos generados por este mismo equipo de trabajo con vacas lecheras en producción alimentadas con RTM como dieta base y 4 o 8 horas de acceso a pastura (Mendoza, 2012a) demuestran la capacidad del bovino sometido a este tipo de dietas mixtas de predecir o anticipar el suministro de los alimentos, regulando su consumo en función de estas expectativas. Estos últimos autores reportaron que animales consumiendo solo RTM consumen igual MS que aquellos que comían RTM más 4h de pastura, pero más que cuando comían RTM más 8h de pastura, si bien todos los animales destinaron la misma proporción del tiempo disponible a alimentarse.

## METABOLISMO ENERGETICO

Si consideramos los Kg de MODI por cada tratamiento como una variable que se relaciona positivamente con el consumo energía (NRC 2001), existió una tendencia del tratamiento RTM+PA a un mayor consumos de MODI respecto al tratamiento Pastura. El consumo promedio de Kg de CNF (3,5 RTM; 3,7 RTM+PA y 1,6 Pastura) fue más del doble (130%) para los tratamientos RTM y RTM+PA respecto al tratamiento Pastura. Con la concentración energética (EM/Kg MS) asignadas en el Cuadro I a la pastura (2,21) y RTM (2,62) el consumo total de EM/animal/día (15,7 RTM; 18,4 RTM+PA y 12,1 Pastura) para los animales que consumían ambos alimentos RTM+PA fue un 52% mayor que para aquellos que consumían únicamente pastura y un 17 % más que los que consumían solo RTM.

Esta diferencia en el consumo de sustratos almidonosos se reflejó a nivel de la acidez ruminal, ya que el tratamiento Pastura, con un menor consumo de CNF, presentó pH mas alcalinos durante todo el día que los tratamientos RTM y RTM+PA. A su vez las dinámicas de pH mantuvieron un patrón general de mayor alcalinidad antes de las 10h y disminución posterior a la misma hora, momento en que se realizaba el cambio diario de alimentos y coincidente en general con la principal comida del día. Los pH encontrados se encuentran próximos a los óptimos para la degradación de la fibra ( $6,7 \pm 0,5$ ) de acuerdo con Van Soest, (1994). El pH ruminal es consecuencia del balance entre la concentración de ácidos y los sistemas tampón propios (búferes salivales) o exógenos (aditivos dietarios); en este sentido, el

nivel de FDN proveniente de forrajes en todas las dietas estuvo por encima de los recomendados para asegurar un correcto estímulo para la rumia y la salivación (NRC, 2001; NRC 1996). Además, la RTM formulada contenía óxido de magnesio y bicarbonato de sodio, lo que contribuyó a mantener los pH ruminales siempre por encima de 6,2 en todos los tratamientos, reflejando un ambiente ruminal saludable (Van Soest, 1994) aunque la relación forraje - concentrado era 25-75. Se ha reportado que la suplementación con pastura a bovinos consumiendo dietas RTM presentaría como beneficio disminuir las fluctuaciones de pH respecto a dietas RTM (Bargo et al; 2002a). Esto no fue comprobado en este trabajo donde los valores de pH fueron más estables a lo largo del día para el tratamiento Pastura, luego RTM+PA y más variables en RTM, si consideramos los rangos y DE de pH como variables de estabilidad.

La glicemia en los rumiantes es consecuencia de la neoglucogénesis hepática que en condiciones de alimentación como las de este experimento utiliza como sustrato fundamentalmente el propionato y lactato producido a nivel ruminal, aunque en dietas ricas en almidón la llegada del mismo al intestino delgado puede contribuir a la absorción de glucosa post ruminal. En este experimento las concentraciones de glucosa se encuentran dentro de los parámetros de referencia para esta especie (44,6 – 84,2 mg/dL) según (Kaneko et al., 1997). Por otro lado Aguerre, (2010) trabajando con animales similares a los utilizados en esta tesis alimentados únicamente con pastura (*Lotus Corniculatus*: 32% MS, 29% FDA y 12,3 % PB) reportó glicemias de 63,5 mg/dl, y cuando se las suplementó al 1,5 % PV con grano de sorgo molido las glicemias reportadas fueron de 74,3 mg/dL. Los niveles de glucosa encontrados en el presente trabajo presentan coherencia biológica con los niveles de consumo y el tipo de alimento recibido, es así que las dinámicas de evolución de la glicemia en las 8 hs registradas difirieron entre tratamientos, reflejado en la interacción tratamiento por hora (Cuadro VII y Figura 4). Estas curvas de glicemia podrían estar reflejando los comportamientos de ingestión y cinética de degradación de los sustratos ingeridos: mientras los animales con pastura realizan un aumento gradual en la cantidad total de alimento ingerido, los alimentados con RTM presentarían mayores consumos matutinos y una degradación del almidón relativamente rápida respecto a la liberación retardada de nutrientes a partir de las fibras vegetales como consecuencia de la rumia. Por su parte, el tratamiento RTM+PA presenta un recuperación de la caída de glicemia cuando se le suministra pastura (Figura 4, hora 3 de muestreo en adelante). La homeostasis glucostática de los rumiantes parece haber establecido dos niveles de glicemias diferente en este experimento, uno entorno a los 70-75 mg/dL (tratamiento Pastura) y otro 80-85 mg/dL (tratamientos RTM y RTM+PA), probablemente influido por los niveles de CNF ingeridos, la producción de propionato y posiblemente mayores absorciones de glucosa en el intestino delgado. Esta mayor llegada de almidón al intestino delgado y absorción consecuente de glucosa puede estar influyendo en los niveles de insulinemia encontrados. La insulinemia de los animales que consumieron RTM fue mayor que los que consumieron solo pastura. El tratamiento RTM tendió ( $p < 0,10$ ) a tener una mayor insulinemia que el tratamiento RTM+PA, reflejando un mayor necesidad de secreción insulínica para mantener la glicemia.

En términos generales los animales que consumieron RTM presentaron como era esperable un metabolismo energético más activo que aquellos que consumieron solo pastura. La inclusión de pastura en un 30% de la MS total ingerida no perjudicó ninguno de los parámetros relevados, sino que contrariamente aumentó la energía total ingerida.

## METABOLISMO DEL N

El consumo de N no difirió estadísticamente entre los tratamientos, pero es de hacer notar que en términos numéricos el tratamiento RTM fue el de menor consumo, seguido por el tratamiento Pastura, y el más alto fue RTM+PA. La ausencia de diferencias entre tratamientos en la concentración de N-NH<sub>3</sub> puede atribuirse en parte a la alta degradabilidad de los componentes nitrogenados de las pasturas templadas. Los valores observados para el tratamiento Pastura son similares a los reportados por (Cajarville et al., 2006) trabajando con vacas secas y una pradera mezcla (*Trifolium repens*, *Festuca arundinacea*, *Lolium multiflorum* y *Lotus corniculatus*) similar a la utilizada en este ensayo y Aguerre et al., 2010 trabajando con vaquillonas en crecimiento y *Lotus corniculatus*. Otro factor que podría tener incidencia en este resultado podría ser una mayor absorción a nivel ruminal de N-NH<sub>3</sub> en el tratamiento Pastura. Esto se debería al mayor pH ruminal registrado en el tratamiento Pastura, lo que determinaría una mayor proporción del N-NH<sub>3</sub> en su forma disociada y por tanto una mayor absorción de este elemento en rumen (Kozloski, 2002). Reafirmando lo reportado por Bargo et al., (2003), la inclusión de 30% de la MS como pastura en la dieta de animales consumiendo RTM no modificó la concentración media de N-NH<sub>3</sub> ruminal. Por su parte Vibart et al., 2010, evaluó el impacto de la adición de cantidades crecientes de pastura en una dieta base RTM sobre la concentración de N-NH<sub>3</sub>, usando fermentadores de flujo continuo, y no encontraron efecto incluso cuando reemplazó el 50% de la MS de la RTM por pastura. En el presente trabajo las oscilaciones de N-NH<sub>3</sub> ruminal fueron mayores para RTM+PA respecto a los otros dos tratamientos. Los valores de N-NH<sub>3</sub> se encontraron siempre por encima de los 5mg/dl valor señalado como mínimo para el correcto desarrollo de los microbios ruminales (Clark et al. 1992).

Los valores de urea en plasma se encontraron dentro de los rangos normales para bovinos en crecimiento (15,5 – 41,9 mg/dl) según Kaneko, J.J; (1997). La uremia en todos los tratamientos estuvo por encima del valor umbral para bovinos en crecimiento planteado por Hamond, (1998) de 15 mg/dl por debajo del cual existiría una deficiencia de PB en la dieta relativa a la ingesta de energía digestible. Por su parte Vibart et al., (2008) observaron una disminución lineal en el nivel de urea en plasma (13,9 a 8,1 mg/dl) en vacas lecheras en lactación al incluir de 0% a 50% de MS de pastura en la dieta, usando una RTM con mayor % de PB que la pastura (*Lolium Multiflorum*) (15,9% RTM y 13,9 % pastura). Por su parte Bargo et al., 2002 reportaron ausencia de efecto de la inclusión de 1/3 (7,5Kg MS) de pastura en la dieta de vacas lecheras alimentadas con RTM, utilizando una pastura con 26,3% PB y una RTM con 16,9% PB. En el presente estudio aunque no se detectaron diferencias en la concentración de N-NH<sub>3</sub> ruminal, se observaron niveles diferentes de uremia que dan cuenta de una utilización diferente del amoníaco ruminal. Encontrándose mayor excreción ureica de nitrógeno en el tratamiento Pastura.

En términos absolutos la excreción total de N no difirió entre tratamientos, y la mayor parte del N fue excretada en las heces, sin detectarse diferencias entre tratamientos. Si difirió la cantidad de N excretado en orina como % del N total excretado, siendo mayor para el tratamiento Pastura respecto a los otros dos tratamientos. Esta diferencia en la excreción urinaria de N es consistente con los mayores niveles de uremia hallados para el tratamiento Pastura. Concordando con la idea general de que la alta degradabilidad ruminal del N en forrajes frescos de pasturas templadas que no es capturado para síntesis de proteína microbiana,

aumenta la excreción urinaria de N (Hoekstra et al., 2007). Por su parte la inclusión de 6h pastura en la dieta de animales consumiendo RTM no modificó el patrón de excreción de N respecto al tratamiento RTM. La tendencia del tratamiento RTM+PA a presentar una mayor digestibilidad del N que el tratamiento RTM, se debe en parte a la mayor digestibilidad del N de la pastura respecto a la RTM. Esta mayor digestibilidad está relacionada al fraccionamiento de las materias nitrogenadas, donde la PB de la pastura presenta unos 5 puntos porcentuales más de PS y una fracción de NIDA menor que la RTM. Existió una tendencia del tratamiento RTM a retener menos N que los otros dos tratamientos en términos absolutos (g). Si se observa porcentualmente, el tratamiento RTM retuvo un 63%, el tratamiento RTM+PA un 68% y el tratamiento Pastura un 75% del N ingerido. Parte de esta diferencia puede explicarse por la mayor síntesis de proteína microbiana del tratamiento RTM y RTM+PA respecto al tratamiento Pastura.

En relación a la SPM, según Clark et al. (1992), cuando el N en rumen no es limitante la SPM está fuertemente relacionada al consumo de MO y a la proporción de ésta que es fermentada en rumen. El menor consumo de CNF explica en parte la menor SPM del tratamiento Pastura respecto a RTM+PA y RTM. Es posible que la disponibilidad de sustratos energéticos de fácil fermentación hayan contribuido a obtener un mayor SPM en los tratamientos RTM y RTM+PA respecto al tratamiento pastura. La mayor SPM de los tratamientos que consumieron RTM puede estar relacionada además a una mayor tasa de crecimiento de los microorganismos amilolíticos que los celulolíticos, una mayor tasa de pasaje y factor de dilución del contenido ruminal (Bach et al., 2005). Los factores que afectan la ESPM son similares a los descritos para la SPM. Concordando con los resultados de Castrillo et al., (2001) una alta EUN podría ser alcanzada con suministros de menos de 400 g de N por animal y por día, siendo la heces la principal vía de excreción de N, mientras que ingestas superiores generan un aumento de la excreción de N urinario.

## CONCLUSIONES

Los animales con acceso durante 6h a la pastura consumieron aproximadamente un 30% de la MS de su dieta como pastura. La inclusión de 6h de pastura en la dieta de vaquillonas consumiendo RTM no disminuyó el consumo de MS o MO. Contrariamente se detectó una tendencia a consumir más MS como % del PV por el tratamiento RTM+PA respecto a RTM.

Los animales consumiendo RTM presentaron mayores consumos de MO, glicemia e insulinemia, que aquellos que consumieron únicamente pasturas, reflejando un metabolismo glucídico más activo. Esto no se afectó con la inclusión de 6 horas de pastura en la dieta.

La SPM fue menor en el tratamiento Pastura respecto al tratamiento RTM y RTM+PA. La ESPM y EUN tendió a ser menor en el tratamiento pastura respecto a RTM. La inclusión de 6 horas de pastura en la dieta de animales consumiendo RTM no afectó la SPM, la ESPM o la EUN en relación a vaquillonas consumiendo únicamente RTM. Paralelamente la inclusión de pastura tendió a aumentar la digestibilidad del N y su retención en comparación con vaquillonas alimentadas únicamente con RTM.

En resumen la inclusión de pasturas en un 30 % de la MS total de la dieta en vaquillonas alimentadas con RTM, no determinó cambios en el aprovechamiento digestivo y metabólico a excepción de una tendencia a mejorar la digestibilidad y retención de N, que no puede ser atribuida a cambios en el ambiente ruminal o a la síntesis de proteína microbiana.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adrien L.M. (2010). Regulación nutricional del estado corporal al inicio del periodo de transición en vacas lecheras en condiciones de pastoreo: Efectos sobre producción de leche, reinicio de la ciclicidad ovárica posparto y parámetros metabólicos. Tesis de Maestría en producción animal. Facultad de Veterinaria, UdelaR, Montevideo, Uruguay.
2. Aguerre Antia, M. (2010). Alimentación con grano de Sorgo a vaquillonas consumiendo una pastura templada: efecto sobre el consumo, el aprovechamiento digestivo y el metabolismo de la glucosa. Tesis de Maestría en nutrición de rumiantes. Facultad de Veterinaria, UdelaR, Montevideo, Uruguay.
3. Bach A, Calsamiglia S, Stern M.D. (2005). Nitrogen Metabolism in the Rumen. *J. Dairy Sci.* 88:(E. Suppl.):E9–E21
4. Balcells J, Guada J.A, Peiró J.M. (1992). Simultaneous determination of allantoin and oxypurines in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 575:1: 153–157
5. Bargo F, Muller L.D, Kolver E.S, Delahoy J.E. (2003). Invited Review: Production and digestion of supplemented dairy cows on pasture. *J. Dairy Sci.* 86:1–42.
6. Bargo F, Muller L.D, Delahoy J.E, Cassidy T.W. (2002b). Performance of high producing dairy cows with three different feeding systems combining pasture and total mixed rations. *J. Dairy Sci.* 85: 2948–2963.
7. Bargo F, Muller L.D, Varga G.A, Delahoy J.E, Cassidy T.W. (2002a). Ruminant digestion and fermentation of high-producing dairy cows with three different feeding systems combining pasture and total mixed rations. *J. Dairy Sci.* 85: 2964–2973.
8. Brock F.M, Forsberg C.W, Buchanan-Smith J.G. (1982). Proteolytic activity of rumen micro-organism and effect of proteinase inhibitor. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44: 561-569.
9. Bryant, M. (1959). Bacterial species of the rumen. *Bacteriol Rev* 23: , 125–153.
10. Cabrita A. R, Dewhurst J.R, Abreu J.M, Fonseca A.J. (2006). Evaluation of the effects of synchronising the availability of N and energy on rumen function and production responses of dairy cows: a review. *Anim. Res.* 55:1–24
11. Cajarville C, Aguerre M, Repetto J.L. (2006). Ruminant pH, N-NH<sub>3</sub> concentration and forage degradation kinetics on cows grazing temperate pastures and supplemented with different sources of grain. *Anim. Res.* 55: 511-520.
12. Caputi P, Méndez C. (2010) Producción de carne en el mundo y la inserción de Uruguay en el comercio exterior. En: Bianchi, G.; Feed, O. D. Introducción a la ciencia de la carne. Buenos Aires, Hemisferio Sur. p 17-49.
13. Castrillo A.R, Kebreab E, Beaver D.E, Barbi J.H, Sutton J.D, Kirby H.C, France J. (2001). The effect of protein supplementation on nitrogen utilization in lactating dairy cows fed grass silage diets. *J. Anim. Sci.* 79:247–253
14. Charlton C, Rutter S.M, East M, Sinclair L.A. (2011). Preference of dairy cows: Indoor cubicle housing with access to a total mixed ration vs. access to pasture. *Applied Animal Behaviour Science* 130: 1–9
15. Chen X.B, Gomes M.J. (1995). Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives - An overview of the technical details. International Feed Resources Unit Rowett Research Institute, Bucksburn Aberdeen, Scotland, UK.
16. Chilibruste P, Gibb M, Tamminga S. (2005). Pasture characteristics and animal performance. In: Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism, 2nd edition (Eds: J. Dijkstra, J. Forbes and J. France). CAB International. Wallingford, UK. pp: 681-706.
17. Church D.C. (1993). El rumiante: fisiología digestiva y nutrición. Zaragoza, Ed. Acribia, 641p.
18. Clark J.H, Klusmeyer T.H, Cameron M.R. (1992). Symposium: Nitrogen metabolism and amino acid nutrition in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 75:2304-2323.
19. Coffee C.J. (1998). Overview of carbohydrate metabolism: The importance of regulating blood glucose levels. En: Coffee, C.J. (1998). *Metabolism*. Ed. Fencehe Creek Publishing. Madison, Connecticut, EEUU, Cap 9, pp.129-139.

20. CONAPROLE (Coperativa Nacional de Productores Lecheros). (2008). Ficha técnica N°8, 1ª Edición, Noviembre 2008.
21. Coppock C.E, Bath D.L, Harris B. (1981). From feeding to feeding systems. *J. Dairy Sci.* 64: 1230-1249.
22. DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). (2010). Encuesta agrícola invierno 2010. Montevideo, Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca.
23. Dillon, P. (2006). Achieving high dry-matter intake from pasture with grazing dairy cows. In: *Fresh herbage for dairy cattle* (Eds: Elgersma, A., Dijkstra, J., Tamminga, S.). Springer. pp: 1-26.
24. Drackley J.K, Overton T.R, Douglas G.N. (2001). Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. *J. Dairy Sci.* 84(E. Suppl.):E100-E112.
25. Eastridge M.L. (2006). Major Advances in Applied Dairy Cattle Nutrition. *J. Dairy Sci.* 89:1311–1323
26. Elizalde J.C, Merchen N.R, Faulkner D.B. (1999). Supplemental cracked corn for steers fed fresh alfalfa: II. Protein and amino acid digestion. *J. Anim. Sci.* 77:467–475.
27. Fobres J.M. (2005) Voluntary feed intake and diet selection. En: Dijkstra J; Fobres J.M; France J. *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism*. CAB International 2ª ed., Cambridge, USA, Cap.23, pp 607-661.
28. Gill, M. (1979). The principles and practice of feeding ruminants on complete diets. *Grass For. Sci.* 34: 155-161.
29. Goering H.K, Van Soest P.J. (1970). Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). *Agric Handbook 379*, USDA.
30. GRAS – INIA. Disponible en: [http://www.inia.org.uy/disciplinas/agroclima/lasat/paginas\\_new/ndvi\\_2012\\_01.html?tipo=ultimeses&aniomes=201106](http://www.inia.org.uy/disciplinas/agroclima/lasat/paginas_new/ndvi_2012_01.html?tipo=ultimeses&aniomes=201106)
31. Hall M.B, Huntington G.B. (2008). Nutrient synchrony: Sound in theory, elusive in practice. *J. Anim. Sci.* 86(E. Suppl.):E287–E292.
32. Hammond A.C. (1998). Use of BUN and MUN as guides for protein and energy supplementation in cattle. *REVISTA CORPOICA.* 2: 44-48
33. Hanson G.D, Cunningham L.C, Morehart M.J, Parsons R.I. (1998). Profitability of moderate intensive grazing of dairy cows in the Northeast. *J. Dairy Sci.* 81: 821–829.
34. Hoekstra N.J, Schulte R.P.O, Struik P.C, Lantinga E.A. (2007). Pathways to improving the N efficiency of grazing bovines. *Europ. J. Agronomy* 26 (2007) 363–374
35. Hoffman P.C, Sievert S.J, Shaver R.D, Welch D.A, Combs D.K. (1993). In situ dry matter, protein and fiber degradation of perennial forages, *J. Dairy Sci.* 76, 2632-2643.
36. Huffman C.F. (1961). High-level grain feeding for dairy cows. *J. Dairy Sci.* 44: 2113-2122.
37. Huntington G.B, Harmon D.L, Richards C.J. (2006). Sites, rates, and limits of starch digestion and glucose metabolism in growing cattle. *J. Anim. Sci.* 84(E. Suppl.):E14–E24.
38. Kellaway R, Porta S. (1993). Feeding concentrates supplements for dairy cows. Dairy Research and Development Corporation. Australia.
39. Keteelars J.J, Tolkamps B.J. (1996). Oxygen efficiency and the control of energy flow in animals and humans. *J. Anim. Sci.* 74: 3036-3051.
40. Kolver E.S, de Veth M.J. (2002). Prediction of ruminal pH from pasture-based diets. *J. Dairy Sci.* 85: 1255–1266.
41. Kolver E.S, Muller L.D. (1998). Performance and nutrient intake of high producing Holstein cows consuming pasture or a total mixed ration. *J. Dairy Sci.* 81: 1403–1411.
42. Kozloski G. V. (2002). *Bioquímica dos ruminantes*. Santa Maria: UFSM.
43. Lapierre H, Lobley G.E. (2001). Nitrogen recycling in the ruminant: A review. *J. Dairy Sci.* 84(Suppl. E):E223–E236.
44. Licitra G, Hernandez TM, Van Soest PJ. (1996). Standarization of procedeurs for nitrogen fractionation on ruminant feeds. *Anim Feed Sci Technol* 57: 347-358.
45. Looor J.J, Soriano F.D, Lin X, Herbein J.H, Polan C.E. (2003). Grazing allowance after the morning or afternoon milking for lactating cows fed a total mixed ration (TMR) enhances trans11-18:1 and cis9,trans11-18:2 (rumenic acid) in milk fat to different extents. *Animal Feed Science and Technology*, v.: 109, p.: 105–119

46. Mangan J.L. (1982). The nitrogenous constituents of fresh forages. In D.J. Thomson, D.E. Beaver, & R.G. Gunn (Eds.), *Forage Protein in Ruminant Animal Production*. (pp. 25-40). Haddington: D. & J. Croal.
47. Mauricio R.M, Mould F. L, Dhanoa M.S, Owen E, Channa K.S, Theodorou M.K. (1999). A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 79: 321-330.
48. Mendoza A, Cajarville C, Colla R, Gaudentti G, Martín M.E, Repetto J.L. (2012<sup>a</sup>). Dry matter intake and behavior patterns of dairy cows fed diets combining pasture and total mixed ration. *Journal of Dairy Science*, v.: 95 (Suppl 2), p.: 716, 2012
49. Mendoza A, Cajarville C, de la Quintana E, Garmendia M.E, Mutuberría E, Repetto J.L. (2012<sup>b</sup>). Milk yield and composition of dairy cows fed diets combining pasture and total mixed ration. *Journal of Animal Science*, v.: 95 (Suppl), p.: 249, 2012
50. Minson D.J. (1990). *Forage in Ruminant Nutrition*. Academic Press, London.
51. Morales E, Soldado A, González A, Martínez A, Domínguez I, Delgado B, Vicente F. 2010. Improving the fatty acid profile of dairy cow milk by combining grazing with feeding of total mixed ration. *Journal of Dairy Research* (2010) 77 225–230.
52. Neel J.P.S, Fontenot J.P, Clapham W.M, Duckett S.K, Felton E.E.D, Scaglia G, Bryan W.B. (2007). Effects of winter stocker growth rate and finishing system on: I. Animal performance and carcass characteristics. *J Anim Sci* 2007.85:2012-2018)
53. NRC. (1996). *Nutrient requirements of beef cattle*. Ed. National Academy Press, 7<sup>o</sup> ed. Washington D.C., USA.
54. NRC. National Research Council. (2001). *Nutrient requirements of dairy cattle*. 7th revised edition. National Academy Press. Washington D.C., USA. 381 p.
55. Poppi D. P, Gill M, France J. (1994). Integration of theories of intake regulation in growing ruminants. *J. Theoretical Biology* 167:129
56. Prins R. A, van Rheenen D.L, Hevant K. (1983). Characterization of microbial proteolytic enzymes in the rumen. *Antonie Leeuwenhoek* 49:585
57. Relling A. E, Mattioli G. A. (2003). Absorción y destino metabólico de los nutrientes. En: Relling A. E, Mattioli G. A. *Fisiología Digestiva y Metabólica de los Rumiantes*. Editorial EDULP, La Plata, Argentina. Cap 4, pp 44-64.
58. Repetto J.L, Cajarville C, D' Alessandro J, Curbelo A, Soto C, Garin D. (2005). Effect of wilting and ensiling on ruminal degradability of temperate grass and legume mixtures. *Anim. Res.* 54:73-78.
59. Reynal S.M, Broderick G.A. (2005). Effect of Dietary Level of Rumen-Degraded Protein on Production and Nitrogen Metabolism in Lactating Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 88:4045–4064
60. Reynolds C. K, Kristensen N.B. (2008). Nitrogen recycling through the gut and the nitrogen economy
61. Reynolds C.K, Huntington G.B, Turrell H.F, Reynolds P.J. (1988). Net metabolism of volatile fatty acids, D-\_-hydroxybutyrate, nonesterified fatty acids, and blood gases by portal-drained viscera and liver of lactating holstein cows. *J. Dairy Sci.* 71:2395-2405.
62. Robertson J.B, Van Soest P.J. (1981). The detergent system of analysis and its application to human foods. En: *The analysis of dietary fiber in food*. Ed. WPT James, O. Theander, M. Dekker. N.Y.
63. Rushen J, de Passillé A.M, von Keyserlingk M.A.G, Weary D.M. (2008). Housing for adult cattle. In: *The welfare of cattle*. Springer. Amsterdam, Netherlands. pp 142-180.
64. Sannes R.A; Messman M.A; Vagnoni B.D. (2002). Form of Rumen-Degradable Carbohydrate and Nitrogen on Microbial Protein Synthesis and Protein Efficiency of Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 85:900–908
65. SAS. (2002). *Statistical Analysis Systems Institute. SAS Version 9. SAS*
66. Schroeder G.F, Couderc J.J, Bargo F, Rearte D.H. (2005). Milk production and fatty acid profile of milkfat by dairy cows fed a winter oats (*Avena sativa* L.) pasture only or a total mixed ration. *New Zeal. J. Agric. Res.* 48: 187–195.
67. She P, Lindberg G.L, Hippen A.R, Beitz D.C, Young J.W. (1999). Regulation of messenger ribonucleic acid expression for gluconeogenic enzymes during glucagon infusions into lactating cows. *J. Dairy Sci.* 82:1153–1163.

68. Sniffen C.J, O'Connor J.D, Van Soest P.J, Fox G, Russell J.B. (1992). A Net Carbohydrate and Protein System for Evaluating Cattle Diets: 11. Carbohydrate and Protein Availability. *J. Anim. Sci.* 70:3562-3577
69. Soriano F.D, Polan C.E, Miller C.N. (2001). Supplementing pasture to lactating Holsteins fed a total mixed ration diet. *J. Dairy Sci.* 84: 2460–2468.
70. Tebot I, Cajarville C, Repetto J.L, Cirio A. (2011). Supplementation with non-fibrous carbohydrates reduced fiber digestibility and did not improve microbial protein synthesis in sheep fed fresh forage of two nutritive values. *Animal* 1-7
71. Theodorou M.K, Williams B.A, Dhanoa M.S, McAllan A.B, France J. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48: 185-197.
72. Tozer P.R, Bargo F, Muller L.D. (2003). Economic Analyses of Feeding Systems Combining Pasture and Total Mixed Ration. *J. Dairy Sci.* 86:808–818
73. Tucker W.B, Rude B.J, Wittayakun S. (2001). Case study: Performance and economics of dairy cows fed a corn silage-based total mixed ration or grazing annual ryegrass during mid to late lactation. *Prof. Anim. Sci.* 17: 195-201.
74. Van Soest P. J. (1994). *Microbes in the Gut*. En P. J. Van Soest, *Nutritional Ecology of the Ruminant* 2<sup>o</sup> edition (págs. 253-280). New York: Cornell University Press.
75. Vibart R.E, Burns J.C, Fellner V. (2010). Effect of Replacing Total Mixed Ration with Pasture on Ruminant Fermentation. *The Professional Animal Scientist* 26 (2010):435–442
76. Vibart R.E, Fellner V, Burns J.C, Huntington J.B, Green J.T. (2008). Performance of lactating dairy cows fed varying levels of total mixed ration and pasture. *J. Dairy Res.* 75: 471–480.
77. Viglizzo E. (1981). *Dinámica de los sistemas pastoriles de producción lechera*. Hemisferio Sur. Buenos Aires. ARGENTINA. 125 p.
78. Williams B.A, Bosch M.W, Martin J.B, Verstegen W.A, Tamminga S. (2005). An in vitro batch culture method to assess potential fermentability of feed ingredients for monogastric diets. *Animal Feed Science and Technology* 123–124 (2005) 445–462