

**Código de la propuesta** FCE\_1\_2014\_1\_104293

**Convocatoria:** Proyecto de investigación Fundamental Fondo Clemente Estable - 2014

### Título del Proyecto (español)

Rol de la oxidación hepática en la regulación del consumo en el corto plazo en animales en pastoreo

### Resumen publicable (español)

Este proyecto hipotetiza que la oxidación a nivel hepático es un factor que interviene en la regulación del consumo de corto plazo (largo del evento de consumo e intervalo entre eventos) en vacas lecheras pastoreando forrajes de calidad. Las señales vinculadas a la oxidación de nutrientes en el hígado (ej, concentración de ATP, acetil Co-A, abundancia y actividad de enzimas de la cadena respiratoria, de la oxidación de ácidos grasos y de la gluconeogénesis) interaccionan con señales metabólica-hormonales y su importancia depende de la demanda energética del animal. El objetivo general es incrementar el conocimiento en la regulación del consumo a corto plazo (señales y mecanismos) en el modelo vaca lechera en sistema pastoriles. El objetivo específico es cuantificar señales de la oxidación hepática y relacionarlas con la conducta en pastoreo y con el patrón endocrino-hormonal considerando la demanda energética del animal. Se realizarán tres experimentos con vacas Holando donde se estudiará el efecto de la paridad (Exp. I), de la forma en que se ofrece la pastura (Exp. II) y de la etapa de lactancia (Exp. III). La ejecución de este proyecto colaborará con la integración de investigadores de diferentes especializaciones en la búsqueda de un abordaje comprensivo e interdisciplinario. El aporte de conocimientos básico en el área de la regulación del consumo a corto plazo conformará las bases biológicas que permitirá desarrollar tecnologías de procesos en sistemas pastoriles lecheros de manera de optimizar el consumo de MS según la demanda energética animal y los recursos alimenticios disponibles

## DATOS DE LA PROPUESTA



**Palabras clave (Español):** consumo, oxidación hepática, pastoreo

**Área/Subárea de conocimiento:** Ciencias Agrícolas / Producción Animal y Lechería

**Disciplina:** Ciencia Animal y Lechería (la biotecnología animal va en "Biotecnología Agropecuaria")

**Especialidad:** Nutricion- Fisiología

**Duración:** 36 meses

**Sector/Núcleo de problemas y oportunidades:** Producción Agropecuaria y Agroindustrial

**Áreas tecnológicas a priorizar:** Ninguna

**Departamento:** Montevideo

**Prpuesta postulada o evaluada ante otra fuente de financiamiento:** NO

Costo ANII (\$U): 1300000

Costo Otros (\$U): 0

Costo Total (\$U): 1300000

**Título del Proyecto (inglés):** Hepatic oxidation role in short term feed intake regulation in grazing animals

**Resumen publicable (inglés):** The hypothesis of the project is that short term feed intake of dairy cows under temperate pastures is controlled by oxidation of fuels in the liver. The signals related to the oxidation of nutrients in the liver (eg, ATP concentration, acetyl Co-A, abundance and activity of enzymes of the respiratory chain, the fatty acid oxidation and gluconeogenesis) interact with metabolic-hormonal signals depending on the energy demand of the animal. The

overall objective is to increase the knowledge on the feed intake regulation, particularly in the dairy cow grazing systems, contributing to understand signals and mechanisms involved. The specific objective is to quantify hepatic oxidation signals and relate grazing behavior and endocrine-hormonal pattern considering the energy demands of the animal. Three experiments using Holstein cows will be conducted. The effects of the animal category, how diet will be offered to the cows and the effect of physiological state will be studied in Exp. I, II y III, respectively.

The implementation of this project will be healthy for the integration of researchers from different specializations ("applied" and "basic") in the search for a comprehensive and interdisciplinary approach. The knowledge generated in this research will give the biological basis to dairy researchers to generate grazing process technologies through the management of pastures and grazing animals in order to optimize herbage intake according to energy demand and the available pasture resources.

**Palabras clave (inglés):** intake, hepatic oxidation, grazing

## ORGANIZACIONES PARTICIPANTES

---



**Institución:** Universidad de la República/Facultad de Agronomía - UDeLaR/Dpto de Producción Animal y Pasturas

**Rol:** Institución Proponente

**País:** Uruguay

**Sector:** Sector Educación Superior/Público

**Institución:** Universidad de la República/Facultad de Agronomía - UDeLaR/Laboratorio de Técnicas Nucleares

**Rol:** Otras Instituciones Participantes

**País:** Uruguay

**Sector:** Sector Educación Superior/Público

**Responsable Científico:** Ana Inés TRUJILLO LEZAMA

**Documento:** Cédula de Identidad: 15545613

**Sexo:** Femenino

**Organización:** Universidad de la República/Facultad de Agronomía - UDeLaR/Dpto de Producción Animal y Pasturas

**Sector:** Sector Educación Superior/Público

**País:** Uruguay

**Carga horaria:** 40 hs. **Cargo actual:** G3. Docente

**Dirección laboral:** Avda. Garzon 780

**Departamento:** Montevideo **Ciudad:** Montevideo

**Código postal:** 12900

**Teléfono:** 23572344 **Correo electrónico:** anatrujister@gmail.com

**Dedicación al Proyecto:** 15 hs. semanales **Meses de participación en el Proyecto:** 36

**Descripción de las tareas a desarrollar en el Proyecto:** Responsable del proyecto. Participación en todas las etapas del mismo

**Investigador:** Mariana CARRIQUIRY FOSSEMALE

**Documento:** Cédula de Identidad: 17571759

**Sexo:** Femenino

**Organización:** Universidad de la República/Facultad de Agronomía - UDeLaR/Dpto de Producción Animal y Pasturas

**Sector:** Sector Educación Superior/Público

**País:** Uruguay

**Carga horaria:** 40 hs. **Cargo actual:** G3. docente

**Dirección laboral:** Avda. Garzon 780

**Departamento:** Montevideo **Ciudad:** MONTEVIDEO

**Código postal:** 12900

**Teléfono:** 23572344 **Correo electrónico:** mcarriquiry@fagro.edu.uy

**Dedicación al Proyecto:** 10 hs. semanales **Meses de participación en el Proyecto:** 36

**Descripción de las tareas a desarrollar en el Proyecto:** Co-responsable del proyecto. Participación en todas las tareas del mismo.

**Investigador:** Ana Laura ASTESSIANO DICKSON

**Documento:** Cédula de Identidad: 27447318

**Sexo:** Femenino

**Organización:** Universidad de la República/Facultad de Agronomía - UDeLaR/Dpto de Producción Animal y Pasturas

**Sector:** Sector Educación Superior/Público

**País:** Uruguay

**Carga horaria:** 40 hs. **Cargo actual:** G2. docente

**Dirección laboral:** Avda. Garzon 780

**Departamento:** Montevideo **Ciudad:** MONTEVIDEO

**Código postal:** 12900

**Teléfono:** 23572344 **Correo electrónico:** lauaste@gmail.com

**Dedicación al Proyecto:** 3 hs. semanales **Meses de participación en el Proyecto:** 12

**Descripción de las tareas a desarrollar en el Proyecto:** Participación en trabajo de laboratorio, análisis e interpretación de resultados y publicación de los mismos. Dirección de trabajos estudiantes de grado

**Investigador:** Alberto CASAL SPERA

**Documento:** Cédula de Identidad: 33008372

**Sexo:** Masculino

**Organización:** Universidad de la República/Facultad de Agronomía - UDeLaR/Dpto de Producción Animal y Pasturas

**Sector:** Sector Educación Superior/Público

**País:** Uruguay

**Carga horaria:** 40 hs. **Cargo actual:** G1. docente

**Dirección laboral:** Avda. Garzon 780

**Departamento:** Montevideo **Ciudad:** MONTEVIDEO

**Código postal:** 12900

**Teléfono:** 23572344 **Correo electrónico:** paco.veterinario@gmail.com

**Dedicación al Proyecto:** 5 hs. semanales **Meses de participación en el Proyecto:** 36

**Descripción de las tareas a desarrollar en el Proyecto:** Participación en trabajo de laboratorio, análisis e interpretación de resultados y publicación de los mismos.

**Investigador:** Diego Antonio MATTIAUDA MELE

**Documento:** Cédula de Identidad: 33549691

**Sexo:** Masculino

**Organización:** Universidad de la República/Facultad de Agronomía - UDeLaR/Dpto de Producción Animal y Pasturas

**Sector:** Sector Educación Superior/Público

**País:** Uruguay

**Carga horaria:** 40 hs. **Cargo actual:** G3. Docente

**Dirección laboral:** Ruta 3 Km 363



**Departamento:** Paysandú      **Ciudad:** Paysandu  
**Código postal:**  
**Teléfono:** 47227950      **Correo electrónico:** dma@adinet.com.uy  
**Dedicación al Proyecto:** 8 hs. semanales      **Meses de participación en el Proyecto:** 36

**Descripción de las tareas a desarrollar en el Proyecto:** Expertise en lechería.

Participación diseño del experimento, interpretación, integración y  
publicación de resultados.

Dirección/co-dirección estudiantes tesis grado y/o posgrado

**Investigador:** Pablo Miguel SOCA PEÑA

**Documento:** Cédula de Identidad: 32167612

**Sexo:** Masculino

**Organización:** Universidad de la República/Facultad de Agronomía - UDeLaR/Dpto de Producción Animal y Pasturas

**Sector:** Sector Educación Superior/Público

**País:** Uruguay

**Carga horaria:** 40 hs.      **Cargo actual:** G4. Docente

**Dirección laboral:** Ruta 3 Km 363

**Departamento:** Paysandú      **Ciudad:** Paysandu  
**Código postal:**  
**Teléfono:** 47227950      **Correo electrónico:** psocape@gmail.com  
**Dedicación al Proyecto:** 5 hs. semanales      **Meses de participación en el Proyecto:** 36

**Descripción de las tareas a desarrollar en el Proyecto:** Expertise en sistemas pastoriles. Relación planta-animal. Diseño, análisis, interpretación y publicación de resultados.

**Investigador:** Pablo CHILIBROSTE SYMONDS

**Documento:** Cédula de Identidad: 29673975

**Sexo:** Masculino

**Organización:** Universidad de la República/Facultad de Agronomía - UDeLaR/Dpto de Producción Animal y Pasturas

**Sector:** Sector Educación Superior/Público

**País:** Uruguay

**Carga horaria:** 10 hs.      **Cargo actual:** G5. Docente

**Dirección laboral:** Ruta 3 Km 363

**Departamento:** Paysandú      **Ciudad:** Paysandu  
**Código postal:**  
**Teléfono:** 47227950      **Correo electrónico:** pablo.chilibroste@gmail.com

**Dedicación al Proyecto:** 5 hs. semanales      **Meses de participación en el Proyecto:** 36

**Descripción de las tareas a desarrollar en el Proyecto:** Expertise en sistemas lecheros en condiciones pastoriles. Participación en diseño de experimentos, analisis, interpretación, integración y publicación de resultados.

**Investigador:** Ana MEIKLE SOLARI

**Documento:** Cédula de Identidad: 16204305

**Sexo:** Femenino

**Organización:** Universidad de la República/Facultad de Agronomía - UDeLaR/Laboratorio de Técnicas Nucleares

**Sector:** Sector Educación Superior/Público

**País:** Uruguay

**Carga horaria:** 40 hs.      **Cargo actual:** G5. Docente

**Dirección laboral:** Las Places 1550

**Departamento:** Montevideo      **Ciudad:** MONTEVIDEO

**Código postal:**

**Teléfono:** 2623106      **Correo electrónico:** meikleana@gmail.com

**Dedicación al Proyecto:** 5 hs. semanales      **Meses de participación en el Proyecto:** 36

**Descripción de las tareas a desarrollar en el Proyecto:** Expertise en determinaciones de los perfiles

metabolico-endocrinos y de biología molecular. Participación en diseño del experimento, interpretación, integración y publicación de resultados

**Investigador:** Maria De Los Angeles BRUNI BORRONE

**Documento:** Cédula de Identidad: 31744392

**Sexo:** Femenino

**Organización:** Universidad de la República/Facultad de Agronomía - UDeLaR/Dpto de Producción Animal y Pasturas

**Sector:** Sector Educación Superior/Público

**País:** Uruguay

**Carga horaria:** 40 hs. **Cargo actual:** G3. Docente

**Dirección laboral:** Ruta 3 Km 363

**Departamento:** Paysandú

**Ciudad:** Paysandu

**Código postal:**

**Teléfono:** 47227950

**Correo electrónico:** mbruni@fagro.edu.uy

**Dedicación al Proyecto:** 5 hs. semanales

**Meses de participación en el Proyecto:** 36

**Descripción de las tareas a desarrollar en el Proyecto:** Expertise en nutrición de la vaca lechera. Interpretación y análisis de los resultados y publicación

**Becario a definir**

**Tipo de beca:** Maestría

**Dedicación al Proyecto:** 30 hs. semanales

**Línea de investigación en el cual el becario desarrollaría su tesis de posgrado:** Regulación del consumo en rumiantes en pastoreo

**Justificar la pertinencia de incluir al becario en el marco de esta propuesta:** En el marco de esta propuesta se prevé que puedan realizar su formación de posgrado al menos un estudiantes de maestría en el Programa de Ciencias Agrarias Opción Ciencias Animales. Esta formación comprenderá aspectos aplicados de manejo de pastoreo en vacas lecheras así como manejo de diversas técnicas de laboratorio. Estos estudiantes se enmarcarán en el trabajo del grupo de investigación en lechería SPL\_uy que busca la formación de un grupo humano con una misión, visión y metodología común para contribuir al desarrollo del sector lechero

**Identificar el tutor:** Ana Inés Trujillo (orientador), Mariana Carriquiry (co orientador)

**Descripción de las tareas a desarrollar en el Proyecto:** Llevar adelante todas las tareas en la fase de experimentación a campo y/o laboratorio que esten relacionadas específicamente con su trabajo de tesis y colaborar en todas las tareas del proyecto en general

## Técnico de apoyo a contratar

**Perfil:** Estudiante de grado/tecnico agropecuario

**Dedicación al Proyecto:** 20 hs.

**Descripción de las tareas a desarrollar en el Proyecto:** Llevar adelante todas las tareas en la fase de experimentación a campo.

**Antecedentes y justificación :** Los mecanismos que controlan el consumo de forraje son procesos complejos en los cuales intervienen múltiples señales (por ej. disponibilidad y calidad de alimentos, productos finales de la digestión, concentraciones de hormonas y metabolitos circulantes, respuestas físicas del sistema gastro-intestinal, factores sociales y ambientales) que son integradas bajo un sistema de comunicación bidireccional con el sistema nervioso central y se traducen en eventos de consumo (EC) o de no consumo.

Si el consumo diario es considerado como la sumatoria de EC individuales discretos (Berthoud, 2002; Forbes, 2007) entender los mecanismos que causan el inicio y la finalización de los mismos permitirá comprender los distintos comportamientos ingestivos en las distintas especies incluyendo el hombre, donde la obesidad se considera la principal causa de reducción de la calidad de vida (Zheng & Berthoud, 2008). En especies productivas, el tiempo que dura cada EC y el intervalo de tiempo entre dichos eventos determinan el total de materia seca consumida por día (CMS) y por lo tanto la producción (Allen et al, 2005; Mattiauda et al, 2013).

Para el estudio de los mecanismos de regulación del consumo en el corto plazo, en humanos y otras especies monogástricas se analizan períodos bien definidos relacionados con la ingesta como son: el estado de ayuno previo a la ingesta, el período justo luego de haber finalizado la ingesta, y el estado post-absorción. Sin embargo, las especies ruminantes y particularmente las que se encuentran en pastoreo, presentan una situación diferente asociada a las características anatómicas del tracto gastro-intestinal (TGI), a los patrones de consumo diario en pastoreo y al consecuente flujo constante de digesta a través del TGI. El CMS (gMS/d) de animales en condiciones de pastoreo es generalmente expresado como una función simple producto del tiempo de pastoreo (minutos/d), tasa de bocado (bocado/minuto) y masa de bocado individual (gMS/bocado) (Allden & Whittaker). El tiempo destinado al pastoreo diario es el producto de la duración de los eventos de EC por el número de eventos que ocurren en el día (Gibb et al, 1998) que en climas templados, son en general entre

3 y 4 al día (al amanecer, al medio día y previo a la caída del sol) (Gregorini et al, 2008). Sin embargo, la función simple definida anteriormente lleva implícita diversos mecanismos complejos de interacción planta-animal-ambiente que aún no han sido totalmente comprendidos. Dentro de una escala temporal-espacial, de horas y potrero, las decisiones y las estrategias de pastoreo tales como cuando comenzar y cuando finalizar la sesión de pastoreo, con qué frecuencia realizar los EC y como se distribuyen a lo largo del día determinarán como los rumiantes organizan su tiempo para tratar de cubrir sus demandas metabólica-nutricionales definidas por el potencial de producción (Chilibroste et al. 2007). Los rumiantes en pastoreo modifican la dimensión de sus bocados, la tasa de bocado y el tiempo de pastoreo en respuesta a cambios de la pastura, a cambios en sus requerimientos metabólicos y señales internas que definen su estado “hambre/saciedad” y a cambios del ambiente y del manejo (Chilibroste et al, 2014, in press).

En el corto plazo, la regulación del consumo está dada por distintas señales que envían los órganos periféricos y definen en gran medida los momentos de inicio y cese de cada EC (Roche et al, 2008, Sartin et al, 2011). Sin embargo, no hay un entendimiento total de los mecanismos con que operan las distintas señales en humanos y otros monogástricos y menos aún en los animales en pastoreo. Numerosas teorías se han desarrollado al respecto. La distensión y llenado del rumen, la tasa de desaparición de distintos pools del rumen, la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) y otros productos de la fermentación ruminal, la osmolaridad ruminal, la concentración de metabolitos y/o hormonas en sangre, son algunas de las señales más estudiadas (Chilibroste, 1999; Ingvarsen & Andersen 2000, Taweel et al., 2004). Otra teoría que ha sido reportada es que los rumiantes comen cierta cantidad de forraje que proporciona un rendimiento óptimo de la energía neta por unidad de oxígeno consumido (Ketelaars y Tolkamp, 1996). Sin embargo, la teoría de control multifactorial, que establece que el inicio y la terminación de una comida es controlado por una combinación de señales más que por una sola señal, es la más ampliamente aceptada (Forbes, 2007; Roche et al, 2008).

La señal de “llenado del TGI” (teoría de distensión física), particularmente del rumen-retículo, ha sido considerada como uno de los principales factores de la

regulación del consumo de forraje en rumiantes (Allen, 1996). Esta teoría es probable que domine el control del consumo bajo condiciones de altos requerimientos y en dietas con alta concentración de fibra de lenta digestión. Sin embargo, en ganado en condiciones de pastoreo de forraje de alta calidad, esta teoría no sería la determinante total del consumo, ya que la tasa de consumo y sus componentes (masa de bocado y tasa de bocado) están más vinculadas al estado de hambre/saciedad o estado metabólico del animal (Chilibroste et al, 1997, 1998, 2007; Soca et al, 1999; Gregorini et al, 2007a), a las características de la pastura (Laca et al., 1992, Gibb et al, 1999; Orr et al, 2004, Chilibroste et al, 2005; Chilibroste et al, 2014 y a efectos ambientales (Champion et al., 1994, Linnane et al., 2001,) que al efecto individual del llenado del rumen. Experimentos realizados con distintas metodologías de modificación de la capacidad ruminal y con manejos que alteraban los períodos de ayuno previo al ingreso del pastoreo así como los diferentes tiempos y momentos (en el día) de acceso a la pastura (Chilibroste et al, 2007; Mattiauda et al, 2013; Soca et al, 2014 in press) modificaron la conducta animal en pastoreo (tiempo efectivo de pastoreo y tasa de consumo) y en el consumo de pastura y/o suplemento). Las características de la pastura, fueron las que principalmente limitaron el tamaño y tasa de bocado y tasa de consumo en el corto plazo, que junto con el tiempo de pastoreo determinaron el consumo total a lo largo del día (Mattiauda et al. 2013).

El ambiente ruminal (ej.pH, AGV, amonio) y la concentración de metabolitos en plasma (ej. ácidos grasos no esterificados (AGNE), betahidroxibutirato) y de hormonas que se producen pre y post-ingestión (ej. ghrelina, insulina, leptina) generan distintas señales que modifican el consumo de pastura/alimento y el balance de energía en vacas lecheras (Chilibroste et al, 2007; Gregorini et al, 2007, Gregorini et al, 2009 a,b; Allen & Bradford, 2012; Mattiauda et al, 2013; Meikle et al, 2013). La asociación entre estas señales humorales y metabólicas y el inicio y cese de los EC en pastoreo, y entre las señales humorales y las variaciones que se producen en los componentes de la tasa de consumo parecen depender fuertemente del estado fisiológico del animal (Patterson et al. 1998, Gibb et al, 1999; Chilibroste et al, 2012) y de otros factores que aún no han sido completamente dilucidados. Dentro de ellos, las señales provenientes



de órganos periféricos relacionados con la oxidación metabólica de nutrientes y generación de ATP podrían constituir elementos que también se integren en las decisiones de iniciar o interrumpir el EC.

En roedores, la oxidación de ácidos grasos en el hígado, en el intestino, y en el músculo (Scharrer y Langhans, 1986; Friedman et al, 1999; Langhans et al., 2011) y la oxidación de carbohidratos como la glucólisis hepática y muscular (Friedman y Tordoff, 1986) provocan estímulos para la finalización de la comida.

Por el contrario, la inhibición de la oxidación periférica de ácidos grasos y carbohidratos aumenta el consumo de alimento (Friedman et al., 1999).

En rumiantes, se ha propuesto que las señales de saciedad pueden provenir del resultado de la oxidación de una variedad de combustibles pero particularmente a nivel hepático; esto es conocido como la teoría de la oxidación hepática (TOH; Allen et al., 2009). La teoría propone que la oxidación hepática se incrementa al consumir alimento, consecuentemente se incrementa la concentración de ATP y el estado energético del hepatocito y disminuye la velocidad de descarga de las neuronas de las vías vagales aferentes hepáticas, esta información integrada en el núcleo del tracto solitario primero y luego en el hipotálamo, genera la sensación de saciedad. De esta manera se postula que el comportamiento ingestivo es controlado por la tasa de disparo de las neuronas de las vías aferentes vagales. El mecanismo por el cual la concentración intracelular de ATP afecta la tasa de disparo del nervio hepático vagal aún no ha sido determinada (Allen et al, 2009). La particularidad de los rumiantes de su fermentación pre-gástrica altera el tipo y patrón temporal de absorción y metabolización de los nutrientes si se la compara con los monogástricos. Asimismo, la capacidad de selección en condiciones pastoriles junto con la variación en la composición química de las pasturas (Delagarde, 2000, Ciavarella et al.2000; Cajarville et al, 2007) modifican las cantidades y proporciones de los distintos AGV producidos en el rumen si se las compara con dietas ofrecidas bajo condiciones estabuladas. La TOH en rumiantes se ha centrado principalmente en la oxidación del propionato (derivado de la fermentación ruminal de carbohidratos rápidamente fermentables) y de los AGNE (incrementados en el torrente sanguíneo durante períodos de balance energético negativo y movilización de grasa corporal). El propionato, es absorbido durante el tiempo que

transcurre entre las comidas y rápidamente es metabolizado por el hígado. Diversos estudios han sido realizados utilizando diferentes protocolos experimentales (diferentes dietas con diferentes tipos de almidón, diferentes infusiones de propionato, dietas suplementadas con grasas protegidas, entre otros) realizados con rumiantes con alimentación controlada en confinamiento (Allen, 2000; Oba & Allen, 2003; Allen et al. 2004, Bradford et al, 2005, 2009, Allen et al, 2009, Stocks & Allen, 2012, 2013). Los mayores efectos hipofágicos de corto plazo han sido reportados con infusiones de propionato, posiblemente debido a las características particulares del metabolismo del propionico a nivel hepático, ya que puede ser utilizado para la gluconeogénesis, puede ser oxidado o también puede estimular la oxidación de la acetil-CoA por anaplerosis. Trabajos recientes realizados con vacas lecheras en lactación tardía en cámaras respiratorias (Derno et al, 2013) apoyan la teoría de la oxidación; los autores concluyen que los incrementos postprandiales de los procesos oxidativos encontrados podrían ser las señales de supresión del consumo, mientras que tasas aceleradas de oxidación de grasas y tasas desaceleradas de oxidación de carbohidratos actuarían como señales para el inicio del consumo. Sin embargo, no existen antecedentes de trabajos realizados que apoyen esta teoría en condiciones de pastoreo. La preferencia de los animales en pastoreo por pasturas con alta concentración de carbohidratos solubles (Ciavarella et al.2000) y la movilización de las reservas corporales que ocurren en la vaca lechera (Meikle et al, 2013) promueven la idea de que la oxidación a nivel hepático pueda constituir una señal más que se integra a la regulación multifactorial del consumo en pastoreo en el corto plazo. En especies productivas en pastoreo, las interrogantes sobre cómo operan las señales internas (a nivel celular/tejido/órgano) del estado “hambre/saciedad en un escenario de competencia en el tiempo diario (pastoreo vs rumia y descanso) y de gasto energético implicado en la selección y cosecha de forraje para satisfacer los requerimientos de mantenimiento y producción, permanecen aún sin respuestas. Una mayor comprensión de las señales del organismo que generan saciedad ayudará también a combatir el problema de la obesidad en humanos.

El modelo vaca lechera en lactación se ajusta muy bien para investigar la integración de señales de corto plazo en la regulación del consumo ya que es posible

monitorear, pre y postprandial, cambios en el TGI, sangre e hígado sin interrumpir el comportamiento de ingestión. Asimismo, este modelo transita naturalmente por diferentes momentos de producción de leche y por ende de demanda energética que están asociados a diferentes mecanismos de regulación del consumo (Allen et al, 2005).

Los antecedentes descritos y el interés por incrementar el conocimiento en la regulación del consumo a corto plazo (señales y mecanismos), particularmente en el modelo vaca lechera en sistema pastoriles, justifican esta propuesta.

**Antecedentes del equipo de trabajo:** Este proyecto se enmarca en una línea de investigación que se viene desarrollando desde larga data por investigadores uruguayos sobre la compleja interacción comportamiento ingestivo – nutrición – metabolismo y manejo del pastoreo en sistemas de producción de leche. Los principales hallazgos realizados en el área endócrina-metabólica durante el periparto y lactancia temprana acorde a la paridad, grado de reserva corporal, biotipo lechero y manejos nutricionales diferenciales antes o después del parto han sido sintetizados por Meikle et al, (2013) mientras que los aportes realizados en el área de consumo en pastoreo, particularmente en las estrategias nutricionales centradas en el manejo del pastoreo en los sistemas lecheros así como en la comprensión de las respuestas funcionales entre la tasa de consumo y su principales componentes (masa, área, profundidad y tasa de bocado) han sido sintetizados por Chilibroste et al. (2007; 2014, in press). La mayor parte de la información surge de varios trabajos experimentales que fueron realizados con proyectos financiados por distintas fuentes (FPTA-INIA, CSIC, PILI-CLALDY).

Asimismo, desde el año 2008 el equipo de trabajo ha llevado adelante una serie de proyectos con un fuerte componente de biología molecular y biotecnología aplicadas a la investigación en producción animal (FPTA-2008#262, FPTA-2008#263, entre otros). Se planea utilizar el conocimiento y metodologías adquiridas en estos proyectos de investigación que tuvieron como parte de su objetivo la comprensión de las variables biológicas que explican la eficiencia energética en ganado de carne. Particularmente, con el FPTA-2008#263 se estudió la eficiencia alimenticia en condiciones de confinamiento y pastoriles asociada a

polimorfismos en genes centrales que participan en la regulación del consumo y metabolismo. En condiciones pastoriles, se midió el consumo en pastoreo y el comportamiento ingestivo sugiriendo los resultados que el tiempo dedicado al pastoreo y la tasa de consumo son indicadores candidatos que podrían estar vinculados a eficiencia en pastoreo (Trujillo et al, 2014, in press).

Recientemente este grupo también ha trabajado en el entendimiento de las variables biológicas asociadas a la nutrición y eficiencia energética en ganado de carne asociados con el metabolismo hepático de carbohidratos y lípidos (Astessiano et al, 2012, 2013) y con proceso de oxidación a nivel mitocondrial (Casal et al, 2014). Asimismo, datos preliminares de expresión génica en hipotálamo involucrados en la regulación del consumo en vacas de cría sometidas a diferentes asignaciones de forraje durante tiempos prolongados (proyectos y pasantías estudiantiles de fin de grado) sugieren que ocurren fenómenos adaptativos al modificarse la expresión de algunos genes orexigénicos (Bassaiztegy et al, 2012). En base a esta información preliminar y con el interés en el estudio de la regulación del consumo en el largo plazo es que se ha presentado un proyecto (CSIC I + D, 2014, responsable: A. I. Trujillo) para solicitar financiamiento.

La propuesta de investigación presentada contempla aspectos específicos sobre la regulación del consumo en pastoreo en el corto plazo, integrando el estudio del comportamiento ingestivo con señales endocrino-metabólicas y con el uso de los combustibles a nivel del hepatocito asociadas con el estado “hambre/saciedad” de la vaca lechera. Esta temática con el enfoque particular de la oxidación hepática como uno de los mecanismos de control en el corto plazo en vacas en pastoreo no ha sido contemplada ni en experimentos nacionales ni a nivel internacional. La comprensión de las señales que gobiernan y los mecanismos involucrados en cuando comenzar y cuando finalizar la sesión de pastoreo y con qué frecuencia realizar los EC asociado con las demandas energéticas de la vaca lechera, permitirá mejorar la estimación del CMS de pastura, base alimenticia de nuestros sistemas pastoriles así como proponer tecnologías de procesos que apunten a optimizar la alimentación y en particular al manejo del pastoreo (ej. tiempo y momento del día de acceso a la pastura,

momento y ubicación en el espacio de los suplementos con respecto al pastoreo).

**Hipótesis de investigación:** Este proyecto que se enmarca en la línea de investigación que viene desarrollando un equipo multidisciplinario sobre la compleja interacción comportamiento ingestivo - nutrición-metabolismo y manejo del pastoreo de bovinos de leche intenta responder las siguientes preguntas:

1. ¿La oxidación hepática interviene en la regulación del consumo en el corto plazo, mediando el largo del evento de consumo y el intervalo entre eventos (inicio y cese de consumo) en animales pastoreando pasturas de alta calidad? ¿Esta regulación es similar en animales con diferentes demandas energéticas (ej. distintas paridades, diferentes etapas de lactancia)?
2. ¿Cómo se relacionan las señales producidas por la oxidación hepática con señales hormonales producidas por órganos periféricos relacionadas con el estado de hambre/saciedad?
3. ¿Las señales producidas por la oxidación hepática en animales pastoreando pasturas de alta calidad son similares si el mismo forraje fuera cortado y ofrecido ad libitum?

La hipótesis general que se plantea es la siguiente:

La oxidación a nivel hepático es un factor de regulación del consumo de corto plazo (largo del evento e intervalo entre eventos de consumo) en vacas lecheras pastoreando forrajes de alta calidad. Las señales vinculadas a la oxidación de nutrientes en el hígado (ej, concentración de ATP, acetyl Co-A, propionil Co-A, abundancia y actividad de enzimas de la cadena respiratoria, de la oxidación de ácidos grasos y de la gluconeogénesis) interaccionan con señales metabólica-hormonales y su importancia depende de la demanda energética del organismo animal.

**Equipamiento actual:** La fase experimental se realizará en la Estación Experimental Mario A. Cassinoni (EEMAC) de Facultad de Agronomía (Paysandú, 1730 ha). La misma cuenta con: 280 ha en rotación de pasturas, rodeo de 120 VO, sala de ordeño, corrales de espera con manga y cepo techados con balanza anexados, corrales para tratamiento y oferta individual de comida y laboratorios de procesamiento primario de muestras leche, sangre, tejido y alimentos.

Los análisis de laboratorio se realizarán en: Laboratorio de Biotecnología Animal de la Facultad de Agronomía (LEBA), en el Laboratorio de Tecnicas Nucleares (LTN) de la Facultad de Veterinaria y laboratorio de Oncología Básica y Biología Molecular (LOBBM) de Medicina. Estos laboratorios cuentan con los equipos que se requieren para la realización de este proyecto

1)LBA (60 m<sup>2</sup>) - freezers a -20C y heladeras - freezer a -80C - autoclave para la esterilización del material y soluciones - sistema agua MilliQ - estufas - centrifugas y microcentrifugas - vortex y baño de agua, - espectofotómetro (NanoDrop) - cubas y fuente de poder para electroforesis. - termociclador 96 pocillos (Applied Life Sciences) - PCR en tiempo real (Bioer) - lector de placas (Thermo) 2)LTN (100 m<sup>2</sup>) - freezers a -20C y heladeras - freezer a -80C - destilador de agua - estufa - centrifugas y microcentrifugas - vortex y baño de agua, - espectofotómetro (NanoDrop) - termociclador 96 pocillos - PCR en tiempo real (Corbett) - lector de placas (Thermo) - gamma contador - autoanalizador semiautomático para análisis de perfil metabólicos (Vitalab Selectra2 autoanalyser). El LOBBM cuenta con los equipos necesarios para medir oxidación mitocondrial.

## Objetivos y actividades

**Referencias bibliográficas y/o técnicas:** Adrien ML et al 2012. Animal. 6 2:292 – 299

Allden WG and Whittaker IA 1970. Aust J Agr Res 21: 755-766.

Allen MS 1996. J Anim Sci 74: 3063–3075.

- Allen MS 2000. J Dairy Sci 83: 83:1598-1624.
- Allen MS et al 2005. Annu Rev Nutr 2005. 25:523–47.
- Allen MS et al 2009. J Anim Sci 87:3317–3334.
- Allen MS and Bradford BJ. 2012. Proceedings of the Nutrition Society. 71: 401–409
- Anil MH and Forbes JM 1988. J Exp Physiol 73: 539–546.
- Astessiano AL et al 2012. J Anim Physiol Anim Nutr(Berl). 96: 535-544.
- Berthoud HR. 2002. Neurosci Bio behav Rev. 26:393–428. [PubMed: 12204189]
- Bines JA et al 1983 Horm Metab Res 15:330–334.
- Bradford BJ and Allen MS. 2008. Domest Anim Endocrinol 34:196–203.
- Bradford B J et al 2008. J Dairy Sci 91:1443–1450.
- Cajarville C et al 2007. Arch Latinoam Prod Anim Vol. 15 (Supl. 1): 408-409.
- Carrquiry M et al 2009. J Dairy Sci 92:4889 – 4900.
- Cassina A and Radi R 1996. Arch Biochem Biophys 328:309-316.
- Ciavarella TA et al 2000. Aust J Agr Res 51: 749-756.
- Champion RA et al 1994. Appl Anim Behav Sci. 42:99–108.
- Chilibroste P et al 1997. Grass Forage Sci 52: 249-603 257.
- Chilibroste P et al 1998 Grass Forage Sci 53:146-156.

Chilibroste P 1999. Ph.D. Diss., Wageningen Agric. Univ.,The Netherlands.

Chilibroste, P. et al 2005. In: Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism, 2nd edition/ Dijkstra, Drir J., F J., Forbes, J.M., France, J.- Wallingford, United Kingdom : CAB International, 2005.

Chilibroste P et al 2007. A review. Aust J Exp Agr, 47: 1075-1084.

Chilibroste P et al 2012. Anim. Feed Sci. and Tech. 173: 201 – 209.

Chilibroste P 2014. Anim Prod Sci, in press.

Delagarde R et al 2000. Anim. Feed Sci. and Tech. 84: 49-68.

Demoz A et al 1995. J Chromatogr B Biomed Appl. 667:148-152.

Derno M et al 2013. J Dairy Sci 96 :971–980

Drackley JK et al 2001. J Dairy Sci 84(E. Suppl.):E100-E112.

Elliot JM et al 1985. J Dairy Sci 68(5):1165-1170.

Friedman MI et al 1999. Am J Physiol 276:R1046–R1053.

Friedman MI and Tordoff MG. 1986. Am J Physiol. 251:R840–R845.

Forbes JM 1996. J Anim Sci 74:3029–3035.

Forbes JM 2007. In: Farm Animals. 2nd edition. CAB Int, Wallingford, UK.

Gibb MJ et al 1998. Grass Forage Sci 53:41-46.

Gibb M 1998. In: Pasture Ecology and Animal Intake, Proceedings, 3, 1996, Dublin, pp.21–37. double-weighing



Gibb MJ et al 1999. Appl Anim Beha Sci 63: 269-287.

Goldberg, S. Y; Gat, A and A. Brosh. 2014. System for remote monitoring of large grazing beef herds. Joint ISNH/ISRP International Conference: Harnessing the Ecology and Physiology of Herbivores. Canberra Australia 8-12 Sept. 2014.

Gregorini P et al 2006. J Anim Sci 84: 1943–1950.

Gregorini P et al 2007a. Grass Forage Sci. 62:346–354.

Gregorini P et al 2007b. Prof Anim Sci 23:642–648.

Gregorini P et al 2008. J Anim Sci 86: 1006-1020.

Gregorini P et al 2009a. J Dairy Sci 92: 2095–2105.

Gregorini P et al 2009b J Dairy Sci 92: 4572–4580.

Gregorini P et al 2011. Livest Sci 137: 287–291.

Herrero M 1995. In: Proceedings of a workshop on Sustainability of Livestock Production Systems, August 8-11, 1995. San José. Costa Rica. Ciencias Veterinarias 17: 72-79.

Holtenius K et al 2003. J. Dairy Sci. 86:883–891.

Ingvartsen KL and JB Andersen. 2000. J Dairy Sci 83:1573-1597.

Ketelaars JJ and Tolkamp BJ 1996. J Anim Sci 74:3036-3051.

Kirby DM et al 2007. In Mitochondria, ed. SchonLAPaEA (Academic Press, San Diego, California), pp. 93-119.

Laca EA et al 1992. Grass and Forage Science, 47, 91-102.

- Langhans W et al d. 2011. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 300:R554–R565.
- Lenard N and HR Berthoud. 2008. Obesity (Silver Spring) Dec;16 Suppl 3:S11-22. doi: 10.1038/oby.2008.511.
- Linnane MI et al 2001. App Anim Beha Sci 71: 277-292.
- Mattiauda et al. 2013. Livest Sci 152: 53–62.
- Meikle A et al 2013. Anim. Feed Sci. and Tech. 186, 139 – 147.
- Oba M and Allen MS 2003a J Dairy Sci 86:174–183.
- Oba M and Allen MS. 2003b. J Nutr 133: 1094–1099.
- Orr RJ et al 2004. App Anim Beha Sci 87:714 205-222.
- Patterson PD et al 2001. Grass.Forage Sci.. 56: 362-373.
- Pinotti R and Rosi F 2006. Horm Metab Res 38, 89-93.
- Penning PD and Hooper GE 1985. Grass.Forage Sci. 40, 79–84.
- Raddatz J 2008. Master thesis. Animal science, faculty of North Carolina State University. <http://repository.lib.ncsu.edu/ir/handle/1840.16/45>
- Roche J R et al 2007. J Dairy Sci 90:1354–1363.
- Roche JR et al 2008. A review. Nutrition Research Reviews 21, 207–234.
- Rook AJ 2000. In: Hopkins, A. ed. Grass: its production and utilization. 3rd edn. Blackwell Science, Oxford, 229-246.
- Saada Reisch A and Elpeleg O 2007. In Mitochondria, ed. SchonLAPaEA (Academic Press, San Diego, California), pp. 199-222.
- Sartin JL et al 2011. J Anim Sci 89:1991–2003.

Scharrer E and W Langhans. 1986. Am J Physiol 250:R1003–R1006.

Shabalina IG et al 2010. Biochim Bio phys Acta 1797:968-80.

Soca P et al 1999. In: Proceedings of international Symposium "Grassland Ecophysiology and Grazing Ecology". Eds. Moraes, A., Nabinger, C., Carvalho, P.C., Alvez, S.J. and Lustosa, S.B. pp 295-298. Agosto 1999. Curitiba. Brasil.

Soca P et al 2014. Effect of restricting time at pasture and concentrate supplementation on herbage intake, grazing behaviour and performance of lactating dairy cows. Submitted.

Stocks SE and Allen MS. 2013. J Dairy Sci 96:4615–4623.

Stocks SE and Allen MS. 2013. J Dairy Sci 95:3259–3268.

Taweel HZ et al 2004. J Dairy Sci 87(10):3417-3427.

Veyga, M. et al 2012. J. Anim. Sci. Vol. 90, Suppl. 3/J. Dairy Sci. Vol. 95, Suppl. 2 pag 320.

Zheng, H and H-R Berthoud. 2008. Physiology 23: 75–83, 2008; doi:10.1152/physiol.00047.

**Estrategia de investigación y metodología:** El proyecto se formula en base a 3 experimentos que se realizarán en la Estación Experimental Mario A.

Cassinoni (EEMAC, Paysandú) de la Facultad de Agronomía, de acuerdo a las regulaciones en el uso de animales en experimentación de la Universidad de la República.

La estrategia planteada se justifica en la necesidad de generar información sobre aspecto vinculados a la regulación del consumo en pastoreo en el corto plazo, por lo tanto se planifican actividades de muestreo concentradas en el tiempo. Los experimentos enfocan aspectos que van desde el nivel celular (hepatocito) hasta niveles comportamentales sobre decisiones de inicio o interrumpir el consumo en pastoreo, integrando aspectos endócrino-metabólicos del

metabolismo energético de la vaca lechera en pastoreo. En los 3 experimentos se aborda la misma temática contemplando aspectos diferentes y complementarios. En el primer año se realizarán los experimentos I (carácter exploratorio) y III donde se estudiará el efecto de la paridad (multípara vs primípara, M vs P) y el efecto de la pastura ofrecida (cortada vs pastoreo, DP vs DC), respectivamente. En el 2do año se realizará el experimento III donde se estudiará el efecto de la etapa de lactancia (temprana vs tardía, LTE vs LTA). En el 3er año se trabajará en la integración de los nuevos resultados al modelo cualitativo existente del proceso de pastoreo (Chilibroste et al, 2014) así como en la publicación de los mismos. Teniendo en cuenta los diferentes procesos biológicos interaccionando en la regulación del consumo abordando la temática de forma integral, e interdisciplinaria contemplando investigadores de diferentes especializaciones. Esta multidisciplinaridad es una estrategia clave para el proyecto ya que éste abarca objetivos específicos de conocimiento aplicado (ej: nutrición y manejo animal) y básico (ej: biología molecular, fisiología, metabolismo y endocrinología animal), imposibles de ser alcanzados por una sola disciplina. Además se busca la maximización de recursos humanos disponibles en el país y de recursos materiales para experimentación y de laboratorios.

### Experimento I.

Animales y diseño experimental:

Se seleccionarán **20 vacas Holando, 10 vacas M y 10 vacas P** de parto de otoño, bloqueadas por fecha probable de parto, peso vivo (PV), condición corporal (CC, entre 3 y 3.5), producción previa y número de lactancias (para M). El experimento tendrá un diseño de bloques al azar con 2 repeticiones en el tiempo (5 animales por bloque y por tratamiento). El experimento tendrá una duración de 24 días totales, 14 de adaptación más 10 días de experimento.

Luego del ordeño AM los animales serán conducidos a una pastura de segundo año mezcla de gramíneas y leguminosas donde pastorearán hasta el ordeño PM. La oferta de forraje de pastura (por encima de 4 cm del suelo) cubrirá el 50% o más de los requerimientos de energía neta de lactación (ENL; NRC, 2001).

Luego del ordeño PM serán conducidos a corrales donde permanecerán hasta el ordeño AM y donde se les ofrecerá un complemento de la pastura (henilaje y/o ensilaje más alimentos concentrados). Los animales tendrán acceso a agua a voluntad.

Determinaciones:

En los animales:

Las vacas serán ordeñadas dos veces por día y la producción de leche individual se registrará diariamente. Se colectarán muestras de leche (durante los dos ordeños) diariamente para realizar una muestra compuesta del período para la determinación de proteína, grasa, lactosa y urea (Milkoscan® Foss FT2). Se determinará PV y CC el día 1 y 10 de experimento.

El consumo de MS total individual de la sesión de pastoreo matinal se realizará durante 3 días consecutivos entre los días 2 y 7 mediante técnica de doble pesado de los animales. Los animales permanecerán en el corral sin agua y sin alimento por 45 minutos para determinar las pérdidas de peso insensibles (vapor, CO<sub>2</sub> y CHA, Gibb, 1998); serán pesados en balanza de precisión de 10 g antes de la sesión de pastoreo, luego de finalizar el pastoreo y luego de los 45 minutos de corral. Además se estimará el consumo a través de la cantidad de forraje desaparecido usando el plato para medir altura comprimida (Ashgrove Plate Meter, Hamilton, New Zealand) calibrado para las condiciones de la pastura (Gregorini et al. 2009).

El comportamiento ingestivo se medirá siempre sobre el pastoreo de la sesión matinal luego del ordeño AM. La tasa de consumo de la sesión de pastoreo será estimada por apreciación visual cada 1 minuto por cada vaca por 5-6 observadores entrenados como se describe en Gregorini et al. (2011) y por la técnica de doble pesada (Penning & Hooper, 1985) en el día 10. Además se utilizarán collares electrónicos (MOOnitor collar, Goldberg et al, 2014) para determinar las actividades diarias de los animales: pastoreo, caminando (sin pastorear) y descanso durante los 10 días de experimentación.

Se colectarán muestras de sangre los días 1 y 7 comenzando previo al ingreso al pastoreo cada 6 horas y durante 24 horas. En el día 10, se realizarán 2

muestreos, uno al momento del cese del primer evento de consumo y el otro 6 hs posterior. Las mismas se colectarán mediante punción de la vena coccígea usando tubos con heparina para la extracción de plasma (centrifugado 2000 Xg, 15 min. a 4°C) para la determinación de la concentración de metabolitos (ácidos grasos no esterificados, betahidroxibutirato, glucosa, acético y propiónico) y de hormonas (insulina, adiponectina, leptina y ghrelina).

Asimismo, se colectarán biopsias de hígado (500 mg aprox; Carriquiry et al., 2009) siguiendo protocolo temporal propuesto por Stocks & Allen (2012) en el momento inmediato antes del ingreso al pastoreo el día 1 (base) y día 7, mientras que en el día 10 se realizará al momento del cese del primer evento de consumo. Las muestras serán colocadas en N líquido y almacenadas hasta -80°C para su procesamiento.

### Análisis de laboratorio

En plasma se determinará las concentraciones de ácidos grasos no esterificados (AGNE), beta-hidroxibutirato (BHB), glucosa, mediante espectrofotolorimetría usando kit comerciales en un autoanalizador Vitalab Spectra 2 (Adrien et al., 2012). Las concentraciones de acético y propiónico serán determinadas por HPLC de acuerdo a Oba & Allen (2003a). Las concentraciones de insulina serán determinadas en un ensayo inmunorradiométrico (IRMA) (INS-IRMA; Diasource, Brussels, Belgium) previamente utilizados en bovinos (Adrien et al., 2012). Las concentraciones de adiponectina serán determinadas con un radioinmunoensayo (RIA) usando un kit comercial (HADP-61 HK, Linco, Millipore) de acuerdo a Raddatz (2008). Las concentraciones de leptina serán determinadas por un radioinmunoensayo (RIA) en fase líquida utilizando el kit comercial Multi-Species Leptin (RIA kit, Millipore, Cat XL-85K) previamente usado en bovinos (Pinotti y Rosi 2006). Las concentraciones en plasma de ghrelina activada (acetilada) serán determinadas usando un kit comercial (Linco Research Inc. St.Charles, MO; Roche et al., 2007).

En el hígado las concentraciones de acetyl-CoA y propionil-CoA serán determinadas de por HPLC de acuerdo a Stocks & Allen (2012) y Demoz et al (1995), respectivamente. La concentración de ATP será medido usando kit bioluminiscente (CLSII ATP bioluminescence assay kit from Roche, Mannheim, Germany).

Para la evaluación de la función mitocondrial hepática se aislarán mitocondrias del hígado por medio de técnicas de centrifugación diferencial (Cassina y Radi, 1996) y se medirá la actividad de las enzimas citrato sintasa y de los complejos I, II y IV de la cadena respiratoria mitocondrial, por técnicas espectrofotométricas (Saada Reisch y Elpeleg, 2007; Kirby et al., 2007). La evaluación de la oxidación mitocondrial y peroxisomal de ácidos grasos en el hígado se llevará a cabo midiendo el consumo de oxígeno dependiente de ácidos grasos en mitocondrias aisladas, utilizando diferentes sustratos (Shabalina et al., 2010).

A su vez, se determinará la expresión de ARNm que codifican para algunas de las enzimas de los complejos mitocondriales (Veyga et al., 2012) y de la oxidación de los ácidos grasos y gluconeogénesis por PCR en tiempo real de acuerdo a Astessiano et al. (2012) y se cuantificará en forma relativa normalizando a un índice de genes control (Pfaffl, 2004).

Las muestras de todos los alimentos (pastura, forraje conservado y alimentos concentrados) se secarán a 60 °C y molerán a 1 mm. En ellos se determinará los contenidos de MS a 60 y 105°C, cenizas, nitrógeno (AOAC, 2000), FDN, FDA y LDA (Van Soest et al. 1991). En los alimentos concentrados y si se utilizara ensilaje se estimará el contenido de almidón según Kozloski et al. (1999). El contenido de carbohidratos no estructurales y ENL de los alimentos se estimará según NRC (2001).

### Experimento II.

Animales y diseño experimental:

Se utilizarán 16 vacas Holando M bloqueadas por fecha de parto (**lactancia media**), PV y CC (entre 3 y 3.5), producción previa y número de lactancias. Los tratamientos serán dieta matinal ofrecida a pastoreo (DP) y la misma dieta cortada y ofrecida en el comedero (DC). El experimento tendrá un diseño de bloques al azar con 2 repeticiones en el tiempo (4 animales por bloque y por tratamiento y una duración de 31 días totales, 21 de adaptación más 10 días de experimento).

El pastoreo se realizará sobre una pastura de segundo año mezcla de gramíneas y leguminosas y la oferta de forraje de pastura (por encima de 4 cm del suelo) cubrirá el 70% o más de los requerimientos de energía neta de lactación (ENL; NRC, 2001). El 30 % restante de los requerimientos se complementará con el aporte de nutrientes y energía proveniente de forrajes conservados (henilajes y/o ensilajes) y mezcla de alimentos concentrados que se ofrecerá a los animales luego del ordeño PM.

Los animales para el tratamiento DC serán dispuestos en corrales individuales y se les ofrecerá en la mañana cantidades cortadas de la misma pastura que se ofrecerán en el tratamiento DP, en condiciones ad libitum.

Las determinaciones en los animales y los muestreos de sangre y biopsias serán similares a lo descrito en el Exp. I. Para el tratamiento DC el consumo de MS será estimado por diferencia entre ofrecido y rechazo. El estudio del control del comportamiento ingestivo (CI) en pastoreo y en corral se realizará desde que los animales ingresan a la pastura y/o corrales hasta el ordeño PM. El CI en los animales del tratamiento DC se realizará por apreciación visual cada 3 minutos durante las mismas horas que se registre en el tratamiento DP la actividad de cada animal. Se estudiará el ritmo de ingestión de cada animal durante 3 días consecutivos entre los días 1 y 7, mediante la determinación de la cantidad de pastura ofrecida y rechazada a cada h durante 6 h/d, a partir del inicio de la ingesta. El consumo de MS acumulada durante las 6 h en relación al inicio de la ingesta, se estimará como la suma de las cantidades de MS ingeridas en cada una de las 6 h. Los análisis de laboratorio serán similares a lo descrito en Exp. I.

### Experimento III:

Animales y diseño experimental:

Se seleccionarán 15 vacas Holando en lactancia temprana (15-30 días posparto) bloqueadas por fecha probable de parto, PV, CC, (entre 3 y 3.5), producción previa y número de lactancia. En estas vacas se determinará el efecto de la etapa de lactancia realizando en las mismas medidas repetidas en dos períodos:



**temprana vs tardía (LTE vs LTA)**. En cada período, se utilizará un diseño de bloques al azar con 2 bloques repeticiones en el tiempo (7 u 8 animales por bloque y por tratamiento). Cada período tendrá una duración de 24 días totales, 14 de adaptación más 10 días de experimento.

Las determinaciones en los animales y los análisis de laboratorio serán similares a las descritas en el Exp. I.

Análisis estadísticos (para los tres experimentos):

Los datos serán analizados con el paquete estadístico SAS (v. 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC), usando un diseño de bloques al azar con un modelo mixto y un análisis de medidas repetidas en el tiempo (si corresponde de acuerdo a la variable) mediante el procedimiento MIXED. El modelo incluirá el efecto del tratamiento (Exp I:paridad: M vs P/Exp II:presentación de la pastura: DP vs DC /Exp III: etapa de lactancia: LTE vs LTA), tiempo (momento de medición) y su interacción como efectos fijos y el bloque y animal como efecto aleatorio.

Los registros de las actividades de pastoreo y descanso obtenidos con los collares electrónicos así como los registros de las actividades obtenidas por observación directa serán analizados como la probabilidad de la actividad en el tiempo con el procedimiento GLIMMIX con distribución binomial y el modelo incluirá tratamiento, intervalo dentro de la sesión y el bloque.

**Objetivo General:** Incrementar el conocimiento respecto a las señales de corto plazo en la regulación del consumo en pastoreo en vacas lecheras de diferentes demandas energéticas, desde una perspectiva fisiológica, metabólica-endocrinológica y de conducta de pastoreo.

**Objetivos específicos:**

Objetivo Específico	Resultado esperado	Observaciones
---------------------	--------------------	---------------

## ESPECIFICACIÓN DE LA PROPUESTA

Cuantificar señales de oxidación hepática (ej. concentración de ATP, acetil CoA, abundancia de enzimas de la actividad mitocondrial y de la oxidación de ácidos grasos) y asociarlas con los perfiles endocrino-metabólicos y el comportamiento ingestivo y conducta en pastoreo en vacas lecheras de distinta paridad (multiparas vs primíparas, Exp I)

Valoración de las señales de oxidación hepática con las señales de consumo y saciedad, con los perfiles endocrino-metabólicos y con medidas de comportamiento ingestivo en vacas multiparas y primíparas. Informe del proyecto, publicaciones científico-técnicas, jornadas/actividades de difusión, formación de RRHH

Cuantificar señales de oxidación hepática (ej. concentración de ATP, acetil CoA, abundancia de enzimas de la actividad mitocondrial y de la oxidación de ácidos grasos) y asociarlas con los perfiles endocrino-metabólicos y el comportamiento ingestivo y conducta en pastoreo en vacas lecheras a las que se le presenta la pastura bajo dos formas diferentes (pastoreo vs ofrecida cortada en comederos, Exp II).

Valoración de las señales de oxidación hepática con las señales de consumo y saciedad, con los perfiles endocrino-metabólicos y con medidas de comportamiento ingestivo en vacas a las que la pastura se le ofreció en pastoreo vs a las que se les ofreció cortada en confinamiento. Informe del proyecto, publicaciones científico-técnicas, jornadas/actividades de difusión, formación de RRHH

Cuantificar señales de oxidación hepática (ej. concentración de ATP, acetil CoA, abundancia de enzimas de la actividad mitocondrial y de la oxidación de ácidos grasos) y asociarlas con los perfiles endocrino-metabólicos y el comportamiento ingestivo y conducta en pastoreo en vacas lecheras de distinta etapa de lactación (temprana vs tardía, Exp III).

Valoración de las señales de oxidación hepática con las señales de consumo y saciedad, con los perfiles endocrino-metabólicos y con medidas de comportamiento ingestivo en vacas de distinta etapa de lactancia (temprana vs tardía). Informe del proyecto, publicaciones científico-técnicas, jornadas/actividades de difusión, formación de RRHH

# ESPECIFICACIÓN DE LA PROPUESTA



## Plan de Trabajo:

Actividad/Mes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	
Ajuste del cronograma, entrenamiento de recursos humano, compra	X	X	X																																		
Ejecución del protocolo experimental del Exp. I ...					X	X																															
Análisis de laboratorio Exp I (hormonas, metabolitos, oxidación h ...							X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X																		
Ejecución del protocolo experimental del Exp. II ...										X	X																										
Procesamiento de datos, interpretación de resultados ...										X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Análisis de laboratorio Exp II (hormonas, metabolitos, oxidación ...												X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X														
Ejecución del protocolo experimental del Exp. III ...																				X	X	X	X	X	X	X											
Análisis de laboratorio Exp III (hormonas, metabolitos, oxidación ...																							X	X	X	X	X	X	X	X							
Integración de los resultados al modelo cualitativo y elaboración ...																																X	X	X	X	X	X

## Descripción de las actividades:

Actividad	Mes inicio/fin	Es hito	Observaciones
Ajuste del cronograma, entrenamiento de recursos humano, compra materiales/insumos. Selección de animales para Exp I y II. Adecuación de instalaciones de trabajo.	1/3	NO	
Ejecución del protocolo experimental del Exp. I	5/6	SI	

## ESPECIFICACIÓN DE LA PROPUESTA



Análisis de laboratorio Exp I (hormonas, metabolitos, oxidación hepática, concentración de ATP, etc)	7/19	SI
Ejecución del protocolo experimental del Exp. II	10/11	SI
Procesamiento de datos, interpretación de resultados	10/34	SI
Análisis de laboratorio Exp II (hormonas, metabolitos, oxidación hepática, concentración de ATP, etc)	12/24	SI
Ejecución del protocolo experimental del Exp. III	18/25	SI
Análisis de laboratorio Exp III (hormonas, metabolitos, oxidación hepática, concentración de ATP, etc)	25/32	SI
Integración de los resultados al modelo cualitativo y elaboración de publicación final	30/36	SI

### Impactos esperados

**Contribuciones del Proyecto:** El proyecto buscará incrementar el conocimiento respecto a las señales de regulación del consumo en el corto plazo en vacas lecheras en sistemas pastoriles. Esta información será inédita para nuestras condiciones y a nivel mundial, en distintas disciplinas como la fisiología y la nutrición. Asimismo, el proyecto generará nuevas hipótesis respecto a las posibles vías para optimizar el consumo de materia seca de acuerdo al potencial productivo del animal y los recursos forrajeros disponibles.

## ESPECIFICACIÓN DE LA PROPUESTA



Por otra parte, parte de los resultados que se generen en el proyecto constituirán el trabajo de tesis de grado y de posgrado de Facultad de Agronomía u otros servicios de la UdelaR. Se espera por lo menos formar 1 estudiante de maestría. Los estudiantes se formarán y entrenarán en diversas técnicas (comportamiento ingestivo, biopsias hepáticas, técnicas de biología molecular).

El proyecto también permitirá dar bases científicas a tecnologías de procesos a nivel de los sistemas productivos lecheros de base pastoril.

**Vinculación con la diáspora:** NO

**Propiedad y uso de los resultados:**

Resultado	Factibilidad de protección	Forma de apropiación
-----------	----------------------------	----------------------

### Otros Aspectos

**Impacto ambiental:** No requiere Autorización Ambiental Previa

**Aspectos éticos:** El proyecto involucra experimentación con animales domésticos (bovinos de leche ) y se realizará de acuerdo a las normas de experimentación animal de la Comisión de Experimentación en el Uso de Animales (CEUA) perteneciente a la Comisión Honoraria de Etica Animal (CHEA).

<b>Personal Técnico</b>						
<b>Nombre</b>	<b>Rol</b>	<b>Categoría</b>	<b>Dedicación</b>	<b>Aporte ANII</b>	<b>Otros Aportes</b>	<b>Total</b>
a contratar / Estudiante de grado/tecnico agropecuario	Técnico de apoyo a contratar	I	20 Hs.Sem - 18 Meses	270000	0	270000
<b>Total \$U: 270000</b>						

<b>Profesores Visitantes</b>						
<b>Nombre</b>	<b>Cantidad/Días</b>			<b>Aporte ANII</b>	<b>Otros aportes</b>	<b>Total</b>
<b>Total \$U: 0</b>						

<b>Consultores</b>					
<b>Nombre</b>	<b>Categoría</b>	<b>Dedicación</b>	<b>Aporte ANII</b>	<b>Otros aportes</b>	<b>Total</b>
<b>Total \$U: 0</b>					

<b>Capacitación</b>						
<b>Nombre</b>	<b>Descripción</b>	<b>Duración</b>	<b>Dedicación</b>	<b>Aporte ANII</b>	<b>Otros aportes</b>	<b>Total</b>
<b>Total \$U: 0</b>						

## PRESUPUESTO: Detalle



Viáticos y Estadías						
Nombre	Destino	Descripción	Duración	Aporte ANII	Otros aportes	Total
Total \$U: 0						

Pasajes						
Nombre	Destino	Descripción		Aporte ANII	Otros Aportes	Total
Total \$U: 0						

Servicios						
Descripción	Proveedor	Duración		AporteANII	Otros Aportes	Total
Total \$U: 0						

Adecuación Edilicia						
Descripción				Aporte ANII	Otros aportes	Total
Adecuación edilicia de facilidades de campo (instalación balanza de precisión)				150000	0	150000
Total \$U: 150000						

Equipamiento Laboratorio						
Cantidad	Descripción	Tipo	Proveedor	Aporte ANII	Otros Aportes	Total

**Total \$U: 0**

**Otros Equipos**

Cantidad	Descripción	Tipo	Proveedor	Aporte ANII	Otros Aportes	Total
11	Collares electrónicos (MOOnito collar)	Adquisición	MOOnitor (Israel)	123750	0	123750

**Total \$U: 123750**

**Material Bibliográfico**

Cantidad	Descripción	Aporte ANII	Otros Aportes	Total
----------	-------------	-------------	---------------	-------

**Total \$U: 0**

**Materiales e Insumos**

Cantidad	Descripción	Aporte ANII	Otros Aportes	Total
750	Determinaciones hormonales (leptina, insulina, ghrelina y adiponectina)	187500	0	187500
750	Determinación de metabolitos (AGNE, BHB y glucosa)	56250	0	56250
750	Determinaciones por HPLC (hígado y sangre)	100000	0	100000
180	Determinaciones de expresión génica en hígado	100000	0	100000
180	Determinaciones de ATP	20000	0	20000
180	Análisis enzimático (hígado)	132500	0	132500
15	Traslados a Paysandú (combustible)	30000	0	30000

**Total \$U: 626250**



## PRESUPUESTO: Detalle



Software y licencias					
Cantidad	Descripción		Aporte ANII	Otros Aportes	Total
Total \$U: 0					

Promoción y Difusión					
Descripción			Aporte ANII	Otros Aportes	Total
Total \$U: 0					

Protección Propiedad Intelectual					
Descripción			Aporte ANII	Otros Aportes	Total
Total \$U: 0					

Imprevistos					
Descripción			Aporte ANII	Otros Aportes	Total
Rotura de materiales o equipos, incrementos de precios, gastos no previstos			65000	0	65000
Total \$U: 65000					

Gastos de Administración					
Descripción			Aporte ANII	Otros aportes	Total

## PRESUPUESTO: Detalle

---

Gastos de administración de proyectos	65000	0	65000
<b>Total \$U: 65000</b>			

## PRESUPUESTO: Resumen de inversiones

Rubro	Aporte ANII	Otros aportes	Total
Personal Técnico	270000	0	270000
Profesores Visitantes	0	0	0
Consultores	0	0	0
Capacitación	0	0	0
Viáticos y Estadías	0	0	0
Pasajes	0	0	0
Servicios	0	0	0
Adecuación Edilicia	150000	0	150000
Equipamiento Laboratorio	0	0	0
Otros Equipos	123750	0	123750
Material Bibliográfico	0	0	0
Materiales e Insumos	626250	0	626250
Software y licencias	0	0	0
Promoción y Difusión	0	0	0
Protección Propiedad Intelectual	0	0	0
Imprevistos	65000	0	65000
Gastos de Administración	65000	0	65000
<b>Total \$U</b>	<b>1300000</b>	<b>0</b>	<b>1300000</b>

Otras fuentes de financiamiento con las que cuenta este proyecto:

## PRESUPUESTO: Cronograma de ejecución



Rubro	Año 1 (\$U)	Año 2 (\$U)	Año 3 (\$U)
Personal Técnico	90000	180000	0
Adecuación Edilicia	150000	0	0
Otros Equipos	123750	0	0
Materiales e Insumos	150000	343750	100000
Imprevistos	25000	20000	20000
Gastos de Administración	22500	22500	20000
<b>Total:</b>	<b>561250</b>	<b>566250</b>	<b>140000</b>

**A continuación se listan los documentos adjuntos:**

Carta aval	(Institución proponente)
Comprobante de tramitación	(constancia de tramitacion CHEA)
Declaración Jurada Investigadores	(DJ Trujillo)
Declaración Jurada Investigadores	(DJ Casal)
Declaración Jurada Investigadores	(DJ. Astessiano)
Declaración Jurada Investigadores	(DJ. Bruni)
Declaración Jurada Investigadores	(DJ. Soca)
Declaración Jurada Investigadores	(DJ. Mattiauda)
Declaración Jurada Investigadores	(DJ Chilibroste1)
Declaración Jurada Investigadores	(DJ Chilibroste2)
Declaración Jurada Investigadores	(DJ Meikle)
Declaración Jurada Investigadores	(DJ Meikle2)
Declaración Jurada Investigadores	(DJ Carriquiry1)
Declaración Jurada Investigadores	(DJ Carriquiry2)
Declaración Jurada Investigadores	(DJ Carriquiry3)

## DOCUMENTOS ADJUNTOS

---



Declaración Jurada establecida en el artículo 71 (Declaracion jurada articulo 71)

Hoja de firmas (Hoja de firmas1)

Hoja de firmas (Hoja de firmas2)

**Exportador de :** FCE\_1\_2014\_1